

MHC

Major Histocompatibility Complex

日本組織適合性学会誌 第5巻第2号 平成10年12月1日発行

Contents

第8回日本組織適合性学会のご案内	87
〔原著論文〕末梢血直接PCR法とPCR-SSP法を併用したHLA-DNAタイピング	
.....大澤 敬子, 西村 直行, 成瀬 妙子, 猪子 英俊	91
〔最新情報:“玉手箱”〕直接塩基配列決定法(SBT)によるクラスI遺伝子タイピング	
.....石川 善英	96
〔最新情報:“玉手箱”〕直接塩基配列決定法(SBT)によるHLAクラスII遺伝子タイピング	
.....成瀬 妙子, 河田 寿子, 猪子 英俊	101
〔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, 猪子 英俊, 成瀬 妙子, 柏瀬 貢一, 木村 彰方, 徳永 勝士, 齋藤 敏, 佐田 正晴, 橋本 光男, 小河原 悟, 前田 平生	107
〔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 貢一, 小林 賢, 成瀬 妙子, 猪子 英俊, 木村 彰方, 徳永 勝士, 齋藤 敏, 佐田 正晴, 橋本 光男, 小河原 悟, 前田 平生	122
〔国際学会印象記〕第12回ヨーロッパ組織適合性学会(EFI)印象記	125
〔国際学会印象記〕第17回国際移植学会に参加して	127
小林 孝彰	127
Q & A	130
小林 賢	130
〔第15回近畿HLA研究会〕	131
日本組織適合性学会よりのお知らせ	142
<日本組織適合性学会誌MHCの投稿規定>	147
編集後記	149
小林 賢	149

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

J S H I

第8回日本組織適合性学会大会のお知らせ

第8回日本組織適合性学会
大会長 佐治 博夫

皆様には益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。第8回日本組織適合性学会大会を下記のとおり開催致します。皆様方におかれましては、多数ご参加くださいますようお願い申し上げます。

会期：1999年7月8日(木)、9日(金)

会場：京都パークホテル・バッキンガムおよびエジンバラ

〒605-0941 京都市東山区三十三間堂廻り町644-2

Tel：075-525-3111, Fax：075-533-1101

大会テーマ：

世紀末にMHCの混沌を語るまたは再び進化と拡散

サブタイトル：1999年、7の月、天から恐怖の大王がやって来て、アンゴルモアの大王をよみがえらせ、その後、Marsが幸せのうちに統治するだろう。

—ノストラダムス：諸世紀第10章72—

プログラム：

● 大野乾シンポジウム：免疫の多様性・MHCの謎・その進化と拡散

桁違いのスケール保持者である大野乾先生を囲み、徳永勝士先生・五條堀孝先生の企画と司会による、素晴らしいシンポジスト達が語る、地球46億年の旅—MHCの進化と拡散→21世紀を展望する—お楽しみに!!

シンポジウムの後、皆様の世界がさらに大きく広がります。

● P. I. Terasaki シンポジウム：MHCの臨床応用・臓器移植と造血幹細胞移植

HLAの移植臨床応用におけるパイオニア、P.I. Terasaki先生を交え、十字猛夫先生・前田平生先生の企画と司会による組織適合性抗原の徹底的な臨床応用について、経験豊かで研究熱心なシンポジスト達が21世紀への展望を語る。臨床に関わる方々は乞ご期待!!

シンポジウムの後、組織適合性抗原がどのように臨床応用され、そして、されるべきかが分かる。

● 未題 シンポジウム：Tissue typer と young scholar のためのシンポジウム

若き professor 木村彰方先生と猪子英俊先生が企画・司会する

Tissue typer と young scholar のためのMHC教室

—ビックリ箱シンポジウム—どのような内容かは当日をお楽しみに!!

● 教育講演：MHC と疾患

西村泰治先生と滝口雅文先生が総括する“MHC と疾患”

講演後、MHC と疾患がどのように関わり合い、治療に応用されていくかを最新情報と共に理解できる、ダイナミック・レクチャー。

● QC ワークショップ

昨年に引き続き行われます QC ワークショップは現在、JSHI の HLA 標準化委員会にて企画中です。

なお、7月8、9日の両日ランチョンセミナーの開催を予定しています。企画を公募致します。

一般演題公募について

◆抄録様式

提出抄録は A4 サイズでプリントアウトした原稿とそのテキストファイルの入ったフロッピーディスク (3.5 インチ 2 HD, 1.44 MB) の両方を提出して下さい。ファイルについては E. mail の添付ファイル (maruya@mbox.kyoto-inet.or.jp) でも受付ます。なお、学会ホームページからの抄録受付も準備しています。

フロッピーディスクには使用したワープロソフト名、Windows または Macintosh、所属、氏名を明記して下さい。内容は演題名、発表者名、所属、本文の順に記載し、字体は明朝体でお願いいたします。文字の大きさは演題名を 12 pt で、それ以外は 10 pt を使用して下さい。演者の前に○印を付記して下さい。本文は目的・方法・結果・考察に分け、800 字以内 (25 文字×32 行) で、英数字は半角文字をご使用願います。

◆演題申込締切り日と申込先

演題締切り日：1999 年 3 月 20 日

抄録、フロッピーディスクおよび抄録受領証 (ハガキ) を下記へ。

申込先：第 8 回組織適合性学会大会事務局 丸屋悦子宛

住所：〒605-0941 京都市東山区三十三間堂廻り町 644

京都府赤十字血液センター研究部内

◆発表様式

発表は例外 (The best abstract, The best poster) を除きポスター形式と致します。なお、ポスター内容を読める程度に縮小し A4 用紙サイズで数枚以内にまとめ、51 部コピーを学会当日、ポスターと共に持ち下さい。その内 1 部をポスター受付で大会本部に提出し、残りはポスター掲示版の下の箱にお入れ下さい。また公募演題のうちから一部口演をお願いします。口演は The best abstract selection committee により選ばれた演題、数題を予定 (発表は学会第 1 日目、6 月中に直接発表者宛にお知らせ致します) そして学会当日、参加者により選ばれたポスター (The best poster 数題：発表は学会 2 日目、OHP でお願い致します) です。

今回、新しい企画として、ポスター内容のコピーサービスを計画しております。発表者に初めの 50 部は用意して頂き、不足につきましては学会本部で追加コピー致します。大切な時間を十分な討論に使えるようご協力願います。

展示パネルについて

1. 写真, 図表は約 2 m の距離から十分判読可能なものにして下さい.
2. パネルの大きさは, 縦 90 cm, 横 180 cm です.
3. ポスターは目的, 方法, 成績及び結論の順に簡潔に構成して下さい.
4. 貼付に必要な画鋏, テープなどはポスター受付に用意してあります.

参加登録費について

事前登録参加費: 5,000 円

平成 11 年 5 月末日までに下記の銀行へ口座振込をお願いします.

懇親会費 (5,000 円) の同時振込みも可能です.

銀行名: あさひ銀行東山出張所

科目: 普通

口座番号: 1073704

加入者名: 第 8 回日本組織適合性学会大会事務局幹事 丸屋悦子

当日登録参加費: 7,000 円

前納, 当日参加者共に, 当日学会受付でネームカード (領収書兼用) をお渡し致します.

懇親会費について

平成 11 年 7 月 8 日 (夜), 堀川の間にて懇親会を開催いたします.

懇親会費: 5,000 円

学会宿泊の御案内

ゆっくりディスカッションの時間を持って頂くため原則として合宿形式を考えています.

学会会場の京都パークホテルとの交渉により, 学会割引で宿泊が準備できます. 料金は以下のとおりです. 予約は大会事務局幹事 (丸屋悦子) まで, FAX (075-541-9485), E-mail (maruya@mbox.kyoto-inet.or.jp) または大会ホームページ (http://square.umin.ac.jp/JSHI/8th_JSHI/8th_JSHI.html) から申し込めます.

京都パークホテル宿泊料金 (学会割引)

【ツインルーム・AとB】

A: ツインルームのシングル使用, 朝食付きサービス料込み (税別) 一泊: 8,500 円

B: ツインルームのツイン使用, 朝食付きサービス料込み (税別) 1人, 一泊: 7,000 円

◆ ツインルームの部屋数 162 室

【デラックスツインルーム・CとD】

C: デラックスツインルームのシングル使用, 朝食付きサービス料込み (税別)

一泊: 15,000 円・・・このタイプでダブルベットも有ります.

D: デラックスツインルームのツイン使用, 朝食付きサービス料込み (税別)

1人一泊: 12,000 円

◆ デラックスツインタイプの部屋数 34 室

【チョットお得な話】

前々泊や後々泊も同料金でサービスされます. MHC の研究・知識の探求に加え, 古都の史跡を訪ね, 頭脳や体のリラックスタイムにもご利用下さい.

注意! : 部屋数に限りがあります。予約受付は随時行っています。お早めに。
予約締切りは平成11年5月末日予定、ただし満室になりましたらご容赦ください。その場合は
近隣のホテルをご紹介します。

ご要望・ご意見・問い合わせなど学会事務局までご連絡下さい。

〒605-0941 京都市東山区三十三間堂廻り町644
京都府赤十字血液センター研究部内
第8回日本組織適合性学会大会事務局
電話 075-531-0111 内線 307
Fax 075-541-9485
e-mail: maruya@mbox.kyoto-inet.or.jp

〔原著論文〕末梢血直接 PCR 法と PCR-SSP 法を併用した HLA-DNA タイピング

大澤 敬子^{1) 2)}, 西村 直行³⁾, 成瀬 妙子¹⁾, 猪子 英俊¹⁾

¹⁾東海大学医学部, 分子生命科学系 ²⁾株式会社ベリタス, 研究開発部 ³⁾株式会社島津製作所, つくば技術センター

(平成 10 年 4 月 17 日 受付)

要約

DNA 抽出をすることなく全血から PCR を行うことができる, 新しい PCR バッファーとなりうる試薬 Ampdirect と, PCR-SSP 法のタイピングキット Dynal SSP とを併用して HLA-DNA タイピングを試みたところ, より迅速で精度の高い HLA-DNA タイピングを行うことができた. DNA を用いた HLA タイピングは近年急速に普及し, DNA 抽出も短時間で行うことができる簡便な方法も用いられているが, DNA 抽出のステップを省けることは時間の短縮のみならず, DNA の取り扱いに不慣れな場合や少量の検体からタイピングを行う場合に有効であり, 検体間の取り違い等の可能性をも軽減することができる. 今後これらを用いた HLA-DNA タイピングは, 移植領域に限らず多くの分野での応用が期待される.

キーワード:

ダイレクト PCR, Ampdirect, PCR-SSP, DNA タイピング

はじめに

PCR (polymerase chain reaction) の普及により, さまざまな HLA DNA タイピング法が次々と開発され, それぞれの施設の設備や検査目的に応じて利用されている. 既に骨髄移植を中心とする移植分野において, DNA タイピングは不可欠であり, 最近では腎移植のためのドナー・レシピエントマッチングにおいても必要とされてきている(1, 2). 特に死体腎移植における緊急検査では, 提供された腎臓を有効に且つ最も適したレシピエントに移植するため, より迅速で高精度なタイピングを行うことが重要である.

DNA タイピングの利点は, 検体より高分子の DNA を採取するために使用する血液の量, 質や鮮度などに関し, 血清学的検査に必要なリンパ球の分

離の際に比べて多くの条件を必要としないことである. 近年, さまざまな DNA 抽出方法が用いられ, キット化されているため, それらを DNA タイピングキットと併せて用いることにより, 試薬調製の手間や特別な装置を使用せずに手軽に行えるようになった. しかしながら使用する DNA の純度や適切な濃度を得ることは大変重要であり, いかに PCR と PCR 後の操作を正確に行っても, 使用する DNA の量や質に問題があるため, 明確な結果が得られない場合もある.

本研究では, 全血より直接 PCR 法を行うことができる Ampdirect™ (島津製作所) を, 市販の DNA タイピングキットのひとつである Dynal SSP キット (Dynal, Norway) (3, 4) と併用して用いることにより, DNA 抽出を行うことなく, より短時間で高精

筆頭筆者連絡先: 〒105-0001 東京都港区虎ノ門
2-7-14 八洲ビル
株式会社ベリタス研究開発部
大澤 敬子

電話: 03-3593-3211
ファックス: 03-3593-3216
E-mail: kosawa@is.icc.u-tokai.ac.jp

度な HLA-DNA タイピングを行うことができたので報告する。

材料と方法

まず一般健康人 2 名の血液を用いて、以下の検討を行った。Ampdirect の添付プロトコールでは、PCR 反応液量 10 μ l 中に加える至適血液量は 0.25 μ l とされているが、使用するプライマーの種類により反応性が異なる場合があると考えられるので、今回使用する Dynal SSP DQ “low resolution” プライマーにおける最適血液量を調べた。PCR は 1 反応液当り滅菌蒸留水 2.5, 2.45, 2.4, 2.35, 2.3 μ l に Ampdirect 2 μ l, 5 mM dNTP 0.4 μ l, Taq DNA Polymerase (Perkin-Elmer) 0.05 μ l ずつを加え、使用するプライマーに相応する HLA 遺伝子型を持つ末梢血をそれぞれに 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 μ l 加えて全量を 5 μ l とし、使用するプライマー本数分の分量を調製した。非特異的反応を防ぐため氷冷下で試薬調製を行い、血液を添加した後は赤血球の色が均一になる程度の非常に穏やかな攪拌を行った。それら反応液各 5 μ l ずつをあらかじめ分注された 5 μ l の Dynal SSP プライマーに加え、PCR 反応を行った。PCR 機器は Gene Amp PCR system 9600 (Perkin Elmer Applied BioSystems) を使用した。PCR 条件は Dynal SSP キットに添付されている条件

(図 1) を使用し、PCR 終了後反応を停止させ、増幅産物のすべてを 2% アガロースゲルにて電気泳動 (100 V, 簡易泳動槽 ミューピットを使用) を行い、エチジウムブロマイドで染色後 UV イルミネーターにて特異的バンドの有無を観察し、写真撮影を行った。

次に既知 HLA 対立遺伝子の健康人ドナー 5 名より、ACD-A 液を抗凝固剤として末梢血を採取し、前述と同様に Ampdirect, 末梢血 1 PCR 反応液当り 0.2 μ l を含む PCR 反応液を作成し、その 5 μ l を Dynal SSP DQB1 low-resolution プライマー 5 μ l に加え、PCR を前述と同じ条件で行った。使用したプライマーの特異性を表 1 に示す。

- 1st step (1 cycle)
Denature 94°C 120 sec.
- 2nd step (10cycles)
Denature 94°C 10 sec.
Annealing & Extension 65°C 60 sec.
- 3rd step (20 cycles)
Denature 94°C 10 sec.
Annealing 61°C 50 sec.
Extension 72°C 30 sec.

図 1. PCR の条件 (Gene Amp PCR system 9600)

表 1. Dynal SSP DQ “low resolution” プライマー特異性

Primer Tube No.	Primer Mix	Size of PCR product	Amplified Spec.
1	DQ5	220 bp	DQB1*0501-0504
2	DQ6	220 bp	DQB1*06011-DQB1*0609,DQB1*0611
3	DQ2	210 bp	DQB1*0201-DQB1*0203
4	DQ2,DQ8	130,150 bp	DQB1*0201,DQB1*0202,DQB1*0302,DQB1*0305
5	DQ7	130 bp	DQB1*0301,DQB1*0304
6	DQ8,DQ9	130,140 bp	DQB1*0302,DQB1*03032,DQB1*0305,DQB1*0306
7	DQ2,DQ7,DQ9	120 bp	DQB1*0203,DQB1*0301,DQB1*03032,DQB1*0306
8	DQ4	210 bp	DQB0401,DQB1*0402

表 2. PCR-SSP 法によるタイピング結果と他法における結果の比較
(Ampdirect 使用, グアニジン法により抽出された DNA 使用と PCR-RFLP 法)

Sample No.	Result of using Ampdirect	Result of using extracted DNA	Result of PCR-RFLP
1	DQB1*06, DQB1*09	DQB1*06, DQB1*09	DQB1*0601, DQB1*0303
2	DQB1*05, DQB1*04	DQB1*05, DQB1*04	DQB1*0501, DQB1*0401
3	DQB1*02, DQB1*07	DQB1*02, DQB1*07	DQB1*0201, DQB1*0301
4	DQB1*06, DQB1*04	DQB1*06, DQB1*04	DQB1*0602/0603, DQB1*0401
5	DQB1*04, DQB1*07	DQB1*04, DQB1*07	DQB1*0401, DQB1*0301

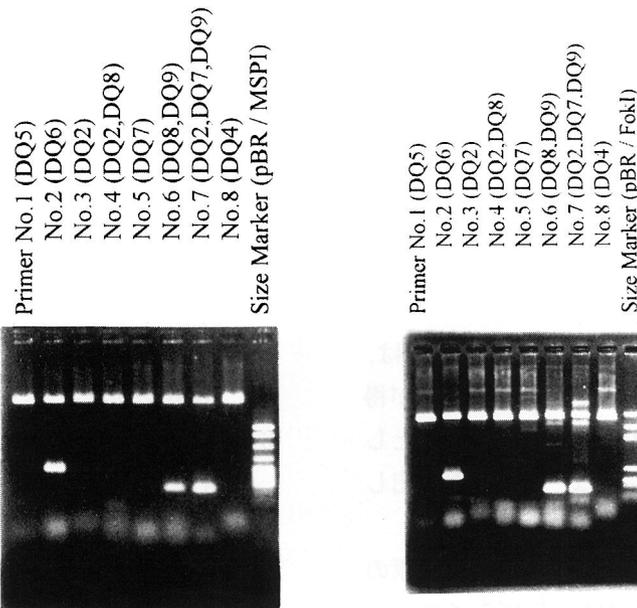
結果

今回使用した Dynal SSP DQ “low-resolution” プライマーにおける至適血液量の検討では, 1 PCR 反応液当りの血液量 0.15 μ l 以上において, すべてのプライマーに良好な陽性バンドが見られた. 有核細胞数の個人差を加味し, 1 PCR 反応液当りの添加血液量は 0.2 μ l が適当と考えられた. また, Ampdirect に添付されている補助試薬 Additional-1 は, 添加の有無による結果の差は見られなかった.

また, Ampdirect を使用した全血直接 PCR 法によ

る, HLA 抗原既知健常人ドナーを用いた Dynal SSP キットでの HLA DQ 抗原タイピングは, グアニジン塩酸法(5)で抽出した DNA を用いてタイピングされた場合と同様な結果を得ることができ, また PCR-RFLP 法で行った結果ともすべて一致した (表 2). 判定用に撮影した写真の一部を図 2 に示す.

採血直後の血液を用いて PCR を行う場合は, サンプルによって PCR の反応効率が良くないことがあるため, SSP キットのプロトコールの PCR 条件を行う前に, pre-heating として 80°C 15 分 1 回, 94



A. Ampdirectを用いて行った直接PCR法によるDQB1タイピング

B. グアニジン法で抽出したDNAを用いて行ったPCR法によるDQB1タイピング

図 2. Ampdirect と Dynal SSP DQB1 low-resolution を併用して行った 2%アガロースゲル電気泳動 (使用血液量 1 PCR 反応液あたり 0.2 μ l, pre-heating は行っていない)

℃ 3分1回を処理したところ、より明瞭な増幅バンドを得ることができた。また PCR 終了後、反応停止薬を加える代わりに、PCR 反応液に、PCR 時の最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 相当のグリセロールと PCR 時の最終濃度 5% 相当の 10 mg/ml クレゾールレッドを加えた場合とでタイピングを行った結果、双方の結果に差は見られなかった。

考察

PCR-SSP 法(6, 7)は検査に要する行程がおよそ2時間と短いことに特色がある方法であり、Ampdirect は、末梢血を直接 dNTP などを含む PCR 反応液に加えるのみで、DNA 抽出を行うことなく直接 PCR を行うことができる。従来の PCR バッファーと代用可能な試薬である(8, 9)。血液中には PCR を阻害する物質が多量に存在するが、Ampdirect はこれら生体試料中の PCR 阻害物質の作用を効率良く抑制できる物質を含んでおり(10)、これを用いることにより、いくつかの前処理工程を経ることなしにそれら阻害物質の作用を除去することが可能になった。本研究のようにこの両者を併用することで、現時点で考えられる最も短時間の HLA-DNA タイピングが達成された。今回行ったタイピングに所要した時間は、試薬調製および分注に 10 分、PCR に約 1 時間 15 分、電気泳動および判定に 20 分、のおよそ計 1 時間 45 分であった。

また使用される抗凝固剤には、ACD、クエン酸ナトリウム、EDTA、また、通常 PCR を行う場合に反応を阻害することがあるため不向きとされているヘパリンでも使用可能である。採血後の血液は、当施設にて冷蔵保存で 3 ヶ月間は安定した結果が得られることを確認したが、HLA タイピング用としてそれより長期の保存に及ぶ際は、DNA を抽出して保存するべきであろう。

Dynal SSP キットを用いて今回行った DQ 抗原の血清学的レベルのタイピングでは、8 プライマー分でわずか 2 μl の血液量で、また同様にして行う DR 抗原のタイピングでは、24 プライマー分で 5 μl の血液量でタイピングを行うことができる。このように、使用する血液量がごく少量でタイピングできるため、特に腎移植などでは、クロスマッチ等の検査

後の残りの血液量でも十分タイピングが可能である。また、今回はクラス II 遺伝子タイピング用のプライマーのみ用いて行ったが、今後クラス I 遺伝子タイピング用プライマーを用いて検討する予定である。

DNA は長期安定保存に適しているが、どの方法を用いても、HLA-DNA タイピングを行うために適当な純度と濃度の DNA を効率よく短時間で得るためには、ある程度の熟練を要する。特に PCR-SSP 法の場合、短時間で簡便なタイピング法である反面、PCR 自体が直接タイピング結果の判定に強く影響するため、使用する DNA の精度に十分注意を払わなければならない。Ampdirect を用いて行う全血直接 PCR 法は、そのような手間を省くことができ、緊急性を要するタイピングには非常に有用であると思われる。また、採血直後の血液に Ampdirect を用いる場合の pre-heating を省くために、試薬内容の再検討を行っている。さらに、血液にのみならず唾液や組織からの直接 PCR に向けた開発もおこなわれているが、完成された暁には直接 PCR 法を用いた HLA-DNA タイピングは、更に多岐に渡る分野で採り入れられると期待する。

参考文献

- 1) Kobayashi T, Tokoyama I, Uchida K, *et al.* : The significance of HLA-DRB1 matching in clinical renal transplantation. *Transplantation* **54**: 238 - 241, 1992.
- 2) Opelz G, Mytilineos J, Scherer S, *et al.* : Analysis of matching in DNA-typed cadaver kidney transplants. *Transplantation* **55**: 782 - 785, 1993.
- 3) 佐田正晴, 辻隆之, Olerup O : PCR-SSP 法を用いた HLA class II 遺伝子の解析. 今日の新移植 **7** (suppl) : 71 - 77, 1994.
- 4) 大澤敬子 : PCR-SSP 法キットによる HLA DNA タイピング. *Lab. Clin. Pract.* **13** : 132 - 137, 1995.
- 5) 小林賢 : 遺伝子の構造と機能の解析 I. 医学検査 **44** : 125 - 135, 1995.
- 6) Olerup O, Zetterquist H : *HLA 1991, Vol. 2* (eds. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), HLA-DRB1 typing

- by polymerase chain reaction amplification with sequence-specific primers. Post-amplification processing in less than 20 minutes. Oxford University Press, Oxford, 1992; p. 315 - 317.
- 7) Olerup O, Zetterquist H : HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* **39** : 225 - 235, 1992.
- 8) 西村直行, 中山知子, 吉田玲子ら : 血液直接PCR法による HLA-DNA タイピングの検討. *MHC* **3** : 311, 1997.
- 9) 杉浦敬子, 篠塚達雄, 武井節子ら : Ampdirect を用いた全血の直接 PCR 法と HLA クラス II 遺伝子の DNA タイピング. *法医学の実際と研究* **40** : 13 - 17, 1997.
- 10) 西村直行 : 血液からの直接遺伝子増幅法 (DNA 抽出不要 PCR 法). *医学のあゆみ* **184** : 158 - 162, 1998.

Whole blood direct PCR method combined with HLA PCR-SSP typing

Keiko Osawa^{1), 2)}, Naoyuki Nishimura³⁾, Taeko K.Naruse¹⁾, Hidetoshi Inoko¹⁾

- 1) Dept. of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan
 2) VERITAS Corporation, Tokyo, Japan
 3) Technology Research Laboratory, Shimadzu Corporation, Ibaraki, Japan

Summary

We have examined Ampdirect™ (Shimadzu Corp., Japan) which is virtually PCR reaction buffer that eliminates the DNA extraction step and allows direct amplification from whole blood. In this study, we applied Ampdirect to the PCR-SSP method using the Dynal SSP kit (Dynal, Norway) to develop the most rapid DNA-based HLA typing protocol by eliminating the time consuming step of DNA extraction. We tested this method for 5 healthy control donors and the primer specific PCR bands were detected as clearly as those obtained using purified DNA extracted by the conventional method, and thus identified alleles were consistent with those previously determined by the PCR-RFLP method. The advantages of Ampdirect combined with the PCR-SSP method are not only to develop faster DNA typing procedure but also to reduce the chance to mix up samples by careless mistake, and further to eliminate technical difficulties associated with DNA purification steps. Ampdirect, hence, can be used as “PCR buffer” for amplification using whole blood, not purified DNA and it might be the most rapid and convenient technique for HLA DNA typing.

Key words :

Direct PCR, Ampdirect, PCR-SSP, DNA typing.

〔最新情報：“玉手箱”〕 直接塩基配列決定法 (SBT) によるクラス I 遺伝子タイピング

石川 善英

日本赤十字社中央血液センター，研究部

1. はじめに

HLA の DNA タイピングはクラス I もクラス II も原理は同じである。しかし多型領域がクラス II では 1 つのエクソンに局在しているのに対し、クラス I では 2 つのエクソンにまたがっている。このためクラス I のタイピングは方法によってはクラス II の 2 倍の手間がかかる。一方でクラス I の血清学的タイピングはクラス II に比べて容易であるため、現在でもクラス I のタイピングは血清学に大きく依存している。しかしクラス I のタイピングはアレルの決定を迫られている。非血縁者間骨髄移植の retrospective study の結果、移植を成功させるためにはクラス I をアレルレベルで適合させる必要があることが明らかとなった(1)からである。現在日本における骨髄移植を目的としたクラス I のタイピングは日本人のアレル頻度を基に、血清学と DNA タイピングを組み合わせて行われている。しかし頻度の低いアレルや外人の検体ではタイピングが困難であり、すべてのアレルを対象としたアレルタイピング法が求められている。

2. クラス I のアレルタイピング

クラス I の DNA タイピング法として PCR-SSP (2)法、-RFLP (3, 4)、-SSOP (5, 6)などが報告されており、これらの一部あるいは全部を使ったタイピングが行われている。SSP 法や RFLP 法は手軽な方法ではある。しかしこれらの方法は必要なプライマーの種類、DNA 量あるいは入手可能な制限酵素の種類などからアレルの決定には限界がある。1994 年に 64 プローブで HLA-C のすべてのアレルを決

定できる SSOP 法が報告されている(5)。また 1996 年に報告された SSOP 法(6)では HLA-A アレルのほとんどを 91 プローブで決めることができた。しかしこれらの方法も現在ではすべてのアレルを決定できるわけではない。1998 年 5 月の段階で A-ローカスは 98、B-ローカスが 213、C-ローカスが 53 アレル報告されている。1996 年当時と比べ A、C アレルは 10 種類以上、B アレルは約 20 種類増えており、今後も増加することは明らかである。

本総説のテーマである SBT 法は数種類のプライマーですべてのアレルを決定でき、アレル数が増えても方法の変更なしに対応できる。しかしこれは方法の原理からの議論であり、原理的には可能だが実際はかなり困難だというのはよくある話である。SBT 法、特にクラス I の SBT 法もそのような例の一つであった。

3. クラス I の SBT

シークエンスによるアレル決定法にはクローニングやグループ特異的 PCR 増幅などでアレルを分けてからシークエンスする方法や、他の DNA タイピング法と組み合わせた方法もある。そのような方法が有用な場合もあるが、本総説では SBT 法をヘテロのサンプルを直接シークエンスすることによりアレルを決める方法と定義して話を進める。

3-1. mRNA からの SBT

クラス I の多型領域が 2 つあるいは 3 つのエクソンに分かれていることがクラス I の SBT 法の大きな障害であった。エクソン 2 から 4 までを genomic

DNA から増幅すると、約 270 bp のエクソンの間に 300 bp あるいは 600 bp のイントロンが入ってしまう。一度のシークエンスで決められる配列の長さは最大でも 700 bp 程度であり、結局 genomic DNA からではエクソン毎にシークエンスを決めることになる。またエクソン毎のシークエンスが分かっても、エクソン間のつながりの確認が困難である。そのため最初に報告されたクラス I-A, B, C の SBT 法は mRNA を用いた方法であった(7)。この方法では ³²P 標識プライマーとオートラジオグラフィーで配列を決めているが、mRNA から自動シークエンサーを使った SBT 法も報告されている(8)。mRNA であればエクソン 2 から 4 まで合わせて 800 bp 程度であり、片側 2 回のシークエンス反応で配列を決定できる (図 1)。しかし mRNA は調製や取扱いが面倒である。

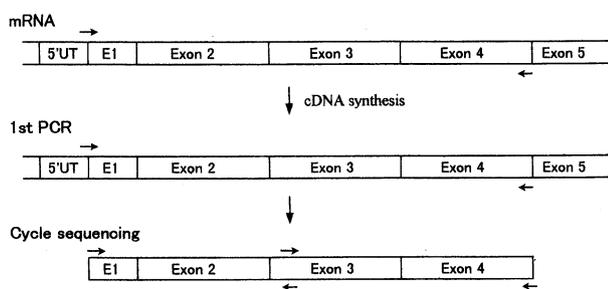


図 1. mRNA からの直接塩基配列決定法

3-2. genomic DNA からの SBT

genomic DNA を用いたクラス I の SBT が可能となった 1 つの大きな要因はシークエンスデータからアリルを決定するコンピューターソフトウェアが開発されたことである。各エクソン毎のシークエンスはシークエンス反応が煩雑であるだけでなく、2 つあるいは 3 つのエクソンにあるヘテロの塩基のすべての組み合わせから 2 つのアリルを決定する作業が必要である。この作業はとてもコンピューターなしには考えられない。アリル決定用のソフトウェアでは各エクソン毎別々に得られるシークエンスデータを 1 本につなげ、シークエンスデータベースと対比しながら、可能性の高いアリルの組み合わせをリストアップしてくれる。このソフトウェアとヘテロの配列を確実に検出できるシークエンス化学がそろえばク

ラス I の SBT が可能となる。

自動シークエンサーを用いたシークエンス方法としてはプライマーを蛍光標識した dye-primer 法と DNA 伸長反応のターミネーターであるダイデオキシヌクレオチドを蛍光ラベルした dye-terminator 法がある。dye-primer 法の方がより長くきれいにシークエンスを読むことができるが、各塩基に対応したシークエンス反応液を別々に調製するため、一方向のシークエンスに 4 本の反応液を調製する必要がある (図 2)。dye-terminator では一方向一本の反応液の調製ですむが、dye-primer 法と比べ、シークエンスデータは乱れやすい。

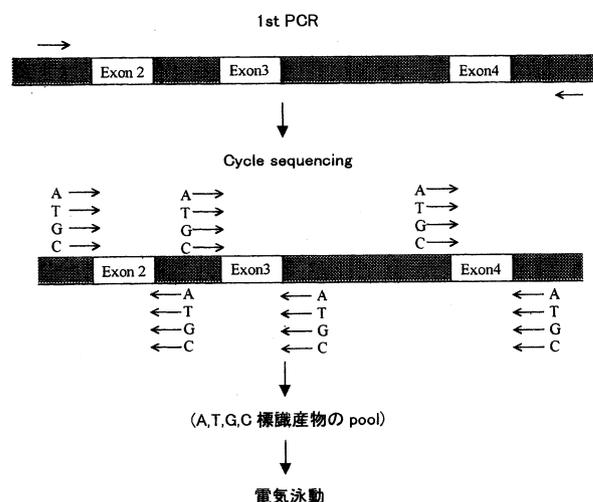


図 2. dye-primer 法によるクラス I の SBT

3-2-1. Dye-primer 法

クラス II の SBT 法と同様、genomic DNA と自動シークエンサー、タイピングソフトウェアを用いた dye-primer 法によるクラス I-A の SBT kit(9)が開発され、第 12 回 国際組織適合性ワークショップで評価された(10)。エクソン 2 から 4 を A-ローカス特異的に増幅し、これを鋳型としてエクソン 2 と 3 の両方向のシークエンスをとるために 16 本のサイクルシークエンシングを行う (図 2)。ABI 方式の自動シークエンサーではシークエンス反応後 4 塩基分を混ぜ 1 つのレーンで泳動する。アリルによってはさらにエクソン 4 も同様に解析する。シークエンスのシグナルピークの高さがきれいに揃っており、ヘテロの箇所ははっきりしたダブルピークになってい

た。しかしこの方法は反応液の調製が複雑であり、あまり普及しなかった。

3-2-2. Dye-terminator 法

HLA のタイピングに限らず自動シークエンサーで塩基配列を決める場合、調製が簡単であることから dye-terminator 法が一般的である。しかしヘテロのシークエンスを決めなければいけない HLA の SBT では dye-terminator 法を用いると、各塩基のピークの高さが不揃いであり、ヘテロの2つの塩基に対応する2つのピークも高さが揃わず、場合によってはシングルピークになってしまう。またピーク位置もずれる場合があり、ヘテロのシークエンスは不可能であった。最近になって Applied Biosystems 社より新しい蛍光色素を用いた dye-terminator 法によるシークエンスキットが発売された。このキットによるシークエンスではピークの高さが dye-primer 法ほどではないがほぼ揃っており、ヘテロの箇所では高さの揃ったダブルピークになる。このシークエンスキットに HLA-A ローカス特異的プライマーおよびシークエンス用プライマーをセットとした SBT kit が発売された。HLA-A SBT kit を使ったアリルタイピングの手順を図3に示した。まず genomic DNA から A ローカス特異的にエクソン1-4を増幅する。シークエンス反応に入る前に、増幅に使ったプライマーを除く。dye-primer 法と異なり、dye-terminator 法ではこの操作を怠ると、シークエンス用プライマー以外に増幅用プライマーもシークエン

ス用プライマーとして働いてしまうため、バックグラウンドシグナルが強くなってしまう。精製した PCR 産物を鋳型とし、各エクソン両方向に設定されたシークエンス用プライマーでシークエンス反応を行う。つまり6本のサイクルシークエンシングでエクソン2, 3, 4の両方向のシークエンスをとることができる。シークエンス反応は96穴のPCRプレートでサンプルDNAとシークエンス用プライマーのマトリックスを作れば反応液調製の間違いを防ぐことができる。シークエンサーにかける前に未反応の蛍光色素を除く必要があるが、96穴プレートのままエタノール沈殿を行うことができる。

アリルの判定はアリルの塩基配列のデータベースと専用の判定ソフトウェアで行う。図4にはその一例を示した。このサンプルは HLA Nomenclature にまだ登録されていない新しいアリルを含んでおり、もちろんソフトウェア内蔵の配列データベースにもその情報は入っていない。判定結果として HLA-A の配列で多型のある箇所の塩基情報が得られる。ヘテロの配列はその組み合わせにより K や M で標記される。またこれまで知られているアリルでは変異のなかった箇所つまりすべてのアリルで共通の配列領域に変異があった場合は特別に Warning report としてその変異が表示される。このサンプルのシークエンスは A*0201 / A*1103 のヘテロのシークエン스에最も近いという結果である。しかしこのサンプルが A*0201 / A*1103 のヘテロだとすると共通領域142番目の変異も含めて4箇所が異なっており、つまりデータベースに含まれていないアリルを含んでいることが分かる。すべての HLA タイピング法に言えることだが、SBT でもすべてのアリルの組み合わせが決定できるわけではない。HLA-A ローカスのアリルの組み合わせのうち SBT で確定できない組み合わせが67種類のアリルを基に調べられている(9)(表1)。どれも片側に希なアリルを含んでおり、どちらが正しいか推定できるが、確定するためにはシークエンスの前にアリルを分ける(10)か、変異が1本のDNA上なのか異なるDNA上なのか判定できるタイピング法を併用する必要がある。

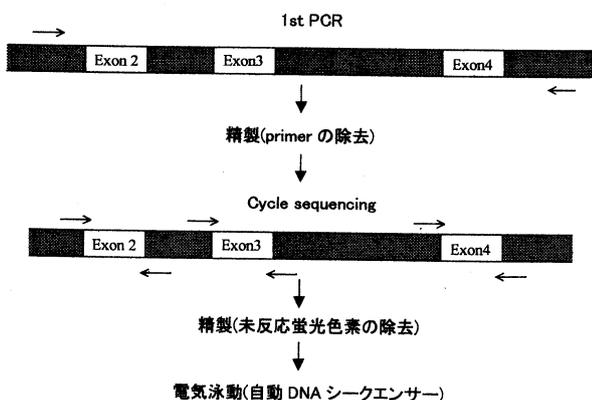


図3. dye-terminator 法によるクラス I の SBT

Sample: 6898 234 Library: A234.L73
 Allele Report: Exact match to: None. See Warnings Below.
 Files : 6898 234

Warning #5: Only one sequence orientation is present.

Warning #6: There are unexpected base calls at these 1 constant positions:

```

1 | nucleotide
4 | number
2 |
G   A234.L73 consensus
K > Sample

```

Polymorphic Position Report

```

111111 1111222222 63 4444444444 4455555555 5555555566 6666666666 7778888888 88 | nucleotide
7899002222 467800133 / 99 0111111245 8900122223 3455677822 3344556779 4680001234 67 | number
8178261367 436003989 / 517 2123468383 9726714678 9559001329 0329126281 2296789953 80 |
TCTWMGCCGG MAGCAGG AGYKT CCCRS AKCCM AYARGCAGGY WCGMSGTTGA RRTSYRRCGA CCACGGGCC YG <> Sample consensus
Y..... R. W. .... A-0201/A-1103

```

図 4. HLA-A SBT kit およびタイピングソフトウェアによる new allele の解析結果

表 1. SBT 法で区別できない
 HLA-A アリルの組み合わせ⁹⁾

A*0201 / 0205 = A*0202 / 0206
A*0201 / 2402 = A*0212 / 2413
A*0205 / 2413 = A*0214 / 2406
A*1101 / 2403 = A*1104 / 2410
A*2301 / 3202 = A*2405 / 3201
A*2402 / 2502 = A*2407 / 2501
A*2402 / 2601 = A*2406 / 2608
A*2402 / 2902 = A*2403 / 2903
A*2402 / 6602 = A*2407 / 6603
A*2402 / 68012 = A*2407 / 6803
A*2501 / 6602 = A*2502 / 6603
A*2501 / 68012 = A*2502 / 6803
A*2502 / 7401 = A*3201 / 6601
A*6602 / 6803 = A*6603 / 68012

67 allele を基に判定

4. 終わりに

クラス I の DNA タイピングはその遺伝子構造によりクラス II に比べ開発が遅れてきた。しかし今回クラス II 用とほぼ同時に HLA-A 用の dye-terminator 法による SBT Kit が発売された。まだ改良の余地はあるが、その目的によっては十分実用的な kit であ

る。dye-primer の kit が紹介された時に dye-terminator kit の開発の予定を聞いたことがあるが、その時は全く予定がないということであった。そのころのシーケンス化学では dye-terminator 法によるヘテロのシーケンスの解析は不可能だったからである。それから約 3 年で dye-terminator の kit が発売された。DNA シークエンサーもキャピラリーの採用により自分でゲルを作る必要がなくなり、またオートサンプラー機能もつくようになった。SBT 法は原理から言えば究極のタイピング法であることは誰もが認めるところであるが、これまで実用性が伴わなかった。しかし状況は急速に変化しており、SBT 法はクラス I も含めた HLA のアリルタイピング法として実用的な方法となっている。ソフトウェア、ハードウェアともに現在改良が進められており、HLA-B 用の SBT キットの発売も決まっている。SBT 法の優れている点はいくつのローカスをタイピングするにしても同じシステムで対応できることである。HLA-A, B, DR をすべて SBT 法だけでタイピングするというのも現実的な選択肢となりつつある。

文献

1. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, *et al.* : Importance of HLA-class I allele matching for clinical outcome after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *New England J. Med.* in press.
2. Tonks S, March SGE, Bunce M, *et al.* : *HLA : Genomic diversity of HLA Functional and Medical Implication, Vol. I* (ed. Charron D), HLA class I DNA typing study. EDK, Paris, 1997 ; p. 199 - 215.
3. Mitsunaga S, Tokunaga K, Kashiwase K, *et al.* : A nested PCR-RFLP method for high-resolution typing of HLA-A alleles. *Eur. J. Immunogenetics* **25** : 15 - 27, 1998.
4. 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, *MHC* **5** : 4 - 17, 1998.
5. Levine JE, Yang SY : SSOP typing of the Tenth International Histocompatibility Workshop reference cell lines for HLA-C alleles. *Tissue Antigens* **44** : 174 - 183, 1994.
6. Date Y, Kimura A, Kato H, *et al.* : DNA typing of the HLA-A gene : population study and identification of four new alleles in Japanese. *Tissue Antigens* **47** : 93 - 101, 1996.
7. Santamaria O, Lindstrom AL, Boyce-Jacino MT, *et al.* : HLA class I sequence-based typing. *Hum. Immunol.* **37** : 39 - 50, 1993.
8. Norgaard L, Fugger L, Jakobsen BK, *et al.* : Sequence-based typing of HLA-A locus using mRNA and a single locus-specific PCR followed by cycle-sequencing with AmpliTaq (DNA polymerase, FS). *Tissue Antigens* **49** : 455 - 465, 1997.
9. Scheltinaga SA, Johnston-Dow LA, White CB, *et al.* : A generic sequencing based typing approach for the identification of HLA-A diversity. *Hum. Immunol.* **57** : 120 - 128, 1997.
10. Johnston-Dow L, Bengtson A, Scheltinga S, *et al.* : *HLA : Genomic diversity of HLA Functional and Medical Implication, Vol. I* (ed. Charron D), DNA sequencing based typing of HLA-A. EDK, Paris, 1997;p.250 - 254.
11. Eberle M, Knapp LA, Iwanaga KK, *et al.* : HLA-B typing by allele separation followed by direct sequencing. *Tissue Antigens* **49** : 365 - 375, 1997.

〔最新情報：“玉手箱”〕 直接塩基配列決定法 (SBT) による HLA クラス II 遺伝子タイピング

成瀬 妙子、河田 寿子、猪子 英俊

東海大学医学部, 分子生命科学系遺伝情報部門

はじめに

Sequencing Based Typing (SBT) 法は, PCR 法で増幅された DNA を用いてシーケンス反応を行い, ゲル電気泳動より得られる塩基配列の情報をもとに, 各対立遺伝子間の塩基配列の多型性をシーケンスレベルで直接検出する検査法として, 第 12 回の国際組織適合性会議 (12th IHWS) において検討された(1). その後各国において究極の DNA 診断法として急速に導入され, 発展してきた. 1994 年, 初のテクニカルセミナーが米国において開催され, 我々も参加したが, 当時においてはまだ DPB1 遺伝子のタイピングのみ可能であった. その後各研究施設において独自の方法によって様々な改良が加えられ, 現在ではクラス II 遺伝子領域のほぼすべての遺伝子座についてタイピング可能となっている. 今回は本稿が“最新情報”の項目であることを考慮して, クラス II 遺伝子の SBT 法についての最新の進展状況について述べることにする.

SBT

SBT 法を最初に学ぶに当たって, SBT の正式名称が sequencing-based typing なのか, sequence-based typing であるかということで悩まれた経験をお持ちの方も多であろう. 本質的には同じ意味ではあるが, 気になるところである. 本年 3 月にフランスで開催された EFI (European Federation for Immunogenetics) の SBT のセッションでも, 最初に触れられたのが名称の呼び方であった. 従来 SBT 法を HLA タイピングに最も早く導入した ABI 社が sequencing-based typing と呼称したのが始まりであ

るが, 現在は両者の呼び方が用いられているようである.

ちなみに, 現在ヨーロッパ地区で SBT 法を導入している施設は 15 施設, 用いられているシーケンサーの機器については, 現在販売している 4 社のうち ABI 10 / 15 施設, ALF (Pharmacia) 5 / 15 施設で, 他 2 社は使用施設 0 と, クラス I 遺伝子 HLA-A のタイピング用キットを発売したこともあって ABI が一歩リードしている感がある. 使用機種が 2 社に限定されているのは, これら 2 社のみよりタイピングキットや付属の解析ソフトが市販され, 普及しているためと考えられる. この両者のタイピング精度については, 12th IHWS において SBT セッションの座長を務めた Utrecht の Tilanus のグループが, 各機種ごとに種々のプライマーと DNA ポリメラーゼを用いて解析を行い, 両者の間で結果に不一致を生じなかったことを報告している(2). ただし, 1 レーンで 4 種の異なる蛍光標識を検出できる ABI 社のシーケンサーの方が, 多検体処理と言う点で現時点では本法に適していると考えられる.

SBT 法によるクラス II 遺伝子の DNA タイピング

直接塩基配列決定法の常法として, シーケンシングは PCR 産物を用いたサイクルシーケンシング(3)法により行う. 実際に SBT 法を行うにあたっては, マニュアル操作か自動シーケンサーを用いるかに大別されるが, 操作性, 自動判定などの点で優れている自動シーケンサーを選択する機会が多い. シーケンサー専用の解析ソフトには, ライ

ブラリーと呼ばれる、使用するプライマーで増幅される領域に関する各対立遺伝子の塩基配列情報が収められており、シークエンシングにより得られた情報を読み込んで、ライブラリー中の各対立遺伝子の塩基配列との異同を検索することにより、対立遺伝子の同定を行う。クラスII 遺伝子の SBT 法と言っても、手順は他のシークエンシングと同一であるので、自家製のプライマーを用いてタイピングが可能であるが、その場合には結果の判定については手作業で塩基配列を判読するか、自家製プライマーによる増幅領域の塩基配列情報を独自に準備する必要がある。一般的にはタイピングキットを用いて付属の解析ソフトによりタイピングを行うことが多い。我々の使用経験のあるキットは ABI 社より 1997 年に発売された DRB 遺伝子 (DRB1, 3, 4, 5) 領域用キットのみであるが、このキットはグループ特異的 PCR 増幅を行い、その後増幅の認められた産物を直接に塩基配列決定に資する。また、従来のキットは Dye primer 法を使用していたが、最近 Big Dye Terminator 法によるキットが発売された。Dye Terminator 法は、操作法は簡便であるにもかかわらず、プライマー直後の 3' 側より 30~50 bp 付近までの塩基配列が判読困難なことが多く、ヘテロ接合体の場合に表れる波形のずれやピークの高さが不均一になる欠点を有していたため、これまで Dye primer 法が好んで用いられてきた。Big Dye

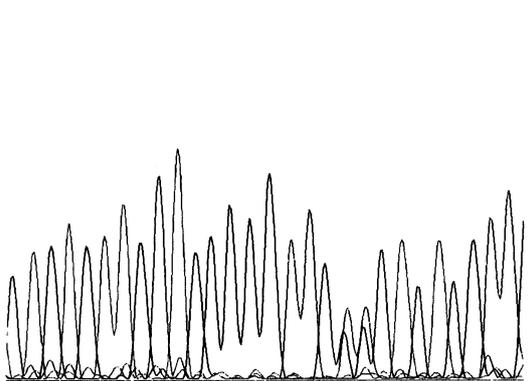
Terminator 法はそれらの問題点を改良し、長い増幅領域でも比較的均一な波形が得られるようになった。販売されているキット以外にも各施設で独自にプライマーセットが開発され、SBT タイピングが試みられているが、現在 DRB1 を中心に、DRB 3, 4, 5, DQA1, DQB1, DPB1 などの領域で SBT 法の報告がなされている(4 - 9)。

クラスII 遺伝子の SBT 法の実情

SBT 法の他法との大きな違いは、後者が多型性を示す領域の周辺のみを検索するのに対し、前者は PCR 産物のすべての塩基配列を検索、決定できることから、対立遺伝子の識別、判定がより厳密に確定可能な点である。例えば、DRB1 遺伝子などでは DR13, 14 などの対立遺伝子数が多いために、他法でルーチン業務としてすべての対立遺伝子を明確に識別することは容易ではないが、SBT 法は塩基配列の多型性を直接検出可能であることから、希な対立遺伝子や、未知の新対立遺伝子も検出可能である。

タイピングを行うサンプルの多くがヘテロ接合体であることから、SBT 法による DNA タイピングの精度はヘテロ部位での二つのピークをいかに正確に判定するかという点である(図1)。しかしながら、実際には DRB1 遺伝子では、キットを含め多くの方法においてグループ特異的プライマーにより増幅

G A C A C A A C T A C G G G G T T G K K G A G A G C T T C
240 250 260



3 C A G A C A C A A C T A C G G G G T T G K K G A G A G C T T C
240 250 260

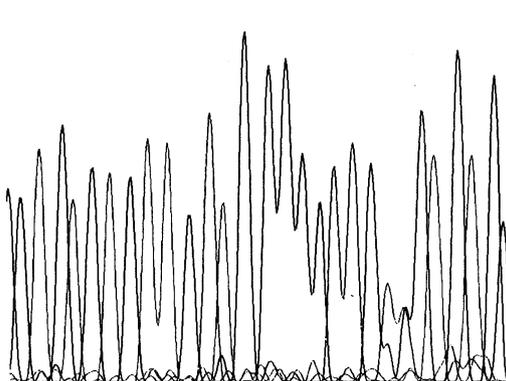


図1. ヘテロの組み合わせのピーク例。左は比較的均一なピークが得られているが、右の例では最初のピークの重なりが不均一なために、解析ソフトでは正しい判定が行えなくなる場合がある。

された DNA を用いてシーケンシングを行うため、2つの対立遺伝子が同一グループで検出されることはあまり多くない。例えば DR 4 / 8 の場合は各々のグループでホモタイプとして検出され、波形の重なりはないので各対立遺伝子の判定は容易である。一方、同一プライマーグループでヘテロの組合

せが出現した場合には、各ピークの高さが均一であり、従ってヘテロの2本のピークがほぼ同じ高さでホモの場合の約1/2であれば、対立遺伝子の識別は容易である。しかしながら、2つのピークの高さが極端に異なる場合には、ホモ接合体と誤って判定される。例えば、表1に示したように、DRB1*1501 /

表1. 同一プライマーグループでのヘテロ接合体の結果

No.	DRBI typed by PCR-RFLP	SBT		
		Pre report	Allele report	Ambiguities
222	1501/1502	15011/15021	15011/15021	0
042	0403/0405	0403/04051	0403/04051	1
		0404/0417	0404/0417	
		0407/0410	0407/0410	
		0408/0411	0408/0411	
		0417/0423	0417/0423	
106	1401/1101	11011/1401	11011/1401	5
		11011/1410	11011/1410	
		11041/1407	11041/1407	
		11042/1407	11042/1407	
		1105/1401	1105/1401	
		1105/1410	1105/1410	
003	1401/1403	1401/1403	1401/1403	4
		1403/1410	1403/1412	
		1407/1412	1407/1412	
113	0802/0803	08021/08032	08021/08032	0
008	1302/1401	?	1301/1407	23
			1302/1401	
			1302/1410	
201	1401/1405	?	1401/1405	2
			1405/1410	

1502, DRB1*0802 / 0803 などの組合せの場合にはピークが均一な高さを示せば判定は容易に行え、対立遺伝子の特定が可能である。ただし、DRB1*0403 / 0405 の組合せの場合、超可変部の塩基の組合せが同一な対立遺伝子の組合せは、全部で5通り存在することになり、SBT法のみでは4

桁レベルでの判定は不可能である(図2)。このような場合には、制限酵素によって切断を行う PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法(2つの制限酵素による double digestion 法)や易動度の差を利用した PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法を併用して同定を行

Preliminary Report: Exact match to: 5 types. See Warnings Below.

Files : 97/03/18 11, 97/03/18 12

Warning #6: There are unexpected base calls at these 1 constant positions:

```

| nucleotide
6 | number
3 |

```

```

G      DRB1.C155 consensus
S >   97/03/18 11
G <   97/03/18 12

```

Warnings for file: 97/03/18 11.

#12: The mobility file 373DRB.Forward-2 is not valid.

Polymorphic Position Report

```

          1111 1111111111 1111122222 2222222222 2222222222 | nucleotide
4444557778 8889990001 1111456777 7777900011 1111122233 333555567 | number
0268074782 4891472890 2379099013 4589978901 2456801201 234247840 |
GGCTTCGTCG CTATTCAGTA GTCTAGRRYC CGTACGCAGA GCGGCGMGCC TACGTTKCA <> 42-4 consensus
..... > 97/03/18 11
..... < 97/03/18 12
..... 0403/04051
..... 0404/0417
..... 0407/0410
..... 0408/0411
..... 0417/0423
..... R..... 0401/0411
..... ..S..... 0403/04052
..... R..... 0403/0409
..... ..A..... 0403/0417
..... ..C..... 0404/04051
..... ..M..... 04051/0406
..... ..A..... 0407/0411
..... ..C..... 0408/0410
..... ..M..... 0410/0420
..... ..M..... 0411/0419
..... R..... 0413/0417
..... R....C.... 0401/0410
..... ..TG.. 0403/0410
..... ..S..... 0404/04052
..... R....C.... 0404/0409
..... ..TG.. 0404/0411 ... more .

```

図2. DR4グループでのヘテロの組合せの判定結果, 今回の結果からは5通りの組合せが考えられる.

うことが望ましい。

DRB1 以外では DQB1, DQA1, DPB1 などの遺伝子でも SBT 法が導入されているが, DQA1 遺伝子の正確な対立遺伝子の同定には, エキソン 2 以外にエキソン 1, 3, 4 などについても検索を行う必要がある。また, DPB1 遺伝子については従来より generic なプライマーにより検索がなされてきたが, 現在報告されている対立遺伝子はすでに 79 種も存在することから, 理論上これらのヘテロでの識別困難な組み合わせは 160 以上にもなるので, 今後はグループ特異的プライマーの採用を検討しなければならないであろう。

鋳型 DNA の調製

キット使用の有無にかかわらず, SBT 法で注意しなければならないもう 1 つの点は, サイクルシーケンシス反応の鋳型として, いかにか高品質の DNA を調製するかということである。ヘテロ接合体で低品質 DNA を鋳型に用いた場合, 各塩基の波形が乱れて 2 つのヘテロの対立遺伝子のピークが不均一になることが多く, 前述のように正しい配列を読み取れなくなるからである。また低品質の DNA の場合にはバックグラウンドのピークが高くなる傾向にあり, 解析ソフトが波形を認識できず, 誤った結果を生じることとなる。現在 SBT 法での鋳型とは, 多くの場合 PCR 法で増幅された DNA のことを意味するが, 高品質な鋳型 DNA を得るためには不純物の少ない PCR 産物を得ることが必要となる。

この鋳型となる PCR 産物の精製については, これまでさまざまな精製方法が試みられてきた。以前には, ストレプトアビジン結合の磁気ビーズを用いる方法が最も高品質な鋳型が得られるとされていたが, 操作がやや複雑なことや, 使用する PCR プライマーをビオチン化する必要があり, あまり普及しなかった。その後, 簡便な PCR 産物の精製キットなどがよく用いられていたが, シークエンシス反応用として開発された DNA 合成酵素である Taq FS polymerase が導入されたことにより, 低品質の鋳型 DNA を用いても低バックグラウンドの維持が可能となっている。また PCR 増幅産物を鋳型とする場合, 従来過剰量の残留プライマーを取り除く必要が

あったが, Taq FS polymerase を用いた場合には PCR 産物を 10 倍希釈したものをそのまま使用することが可能であり, 現在では精製にさほど神経質になる必要はなくなった。従って現段階では, PCR での特異的な増幅効率を上げるためには, PCR 産物を得るための鋳型である高品質な高分子 DNA を用いることが肝要である。

また, PCR 増幅産物である鋳型 DNA の精製度に関し, 一部の施設では PCR 産物をクローニングして用いることを推奨しているようである。特に最近では挿入効率のよい簡便な TA クローニングキットが市販され, PCR 産物のサブクローニングが手軽に行えるようになってきている。しかしながら組織適合性検査の場合には時間とコストの削減が要求されるので, 一般的にはクローニング法が有効とはいえない。

今後の課題

SBT 法の技術は開発当初より数々の改良が加えられ, 現在では結果判定までの時間も大幅に短縮され, 操作性も向上した。しかしながら, 結果判定までには約 1 日が必要なこと, また, 他法に比してコストが割高なこともあり, 通常検査法としての導入は, いまだ広く普及しているとはいえない。現在 DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DPA1, DPB1 などでは改良が進み, 片鎖のみの解析でも十分信頼性の高い結果が得られるため, コストの低下を考えるに当たっては, 両鎖の解析は必ずしも必要ではないかも知れない。

対立遺伝子の同定については, 次々に報告される新対立遺伝子の情報までをも含めると, 今後はコンピューターソフトを使用しての対応が迫られるであろう。最近の市販の解析ソフトについてはライブラリーが各自書き込み自由となり, 新たに報告された対立遺伝子をユーザー自身で加えることが可能になったことで, 新対立遺伝子への対応が迅速になった。とはいえこの作業は労力を要する為, 可能であれば各販売会社による適時バージョンアップサービスが望ましい。また, 本法の唯一の欠点ともいえるヘテロの識別困難な組み合わせについても, 情報提供を随時行うなど, サポート面の充実も期待したい。本

法は数ある DNA タイピング法の中では最も高精度の結果を期待できる方法であり、今後は骨髄移植などのドナー検索法としての応用が期待される。

文献

- 1) Tilanus MGJ, *et al.* : HLA : Genetic diversity of HLA functional and medical implication, Vol. 1 (ed.Charron D), HLA sequencing based typing. EDK Medical and Scientific International Publisher, Paris, 1997 ; p. 237 - 268.
- 2) Voorter CEM, Rozemuller EH, de Bruyn-Geraets D, *et al.* : Comparison of DRB sequence-based typing using different strategies. *Tissue Antigens* **49** : 471 - 476, 1997.
- 3) Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, *et al.* : DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **85** : 9436 - 9440, 1988.
- 4) Mc Ginnis MD, Conrad MP, Bouwens AGM, *et al.* : Automated, solid-phase sequencing of DRB region genes using T 7 sequencing chemistry and dye-labeled primers. *Tissue Antigens* **46** : 173 - 179, 1995.
- 5) Knipper AJ, Hinney A, Schuch B, *et al.* : Selection of unrelated bone marrow donors by PCR-SSP typing and subsequent nonradioactive sequence-based typing for HLA DRB 1 / 3 / 4 / 5, DQB1 and DPB1 alleles. *Tissue Antigens* **44** : 275 - 284, 1994.
- 6) Voorter CEM, de Bruyn-Geraets D, van den Berg-Looenen EM : High resolution HLA typing for the DRB 3 / 4 / 5 genes by sequence-based typing. *Tissue Antigens* **50** : 283 - 290, 1997.
- 7) Rozemuller EH, Bouwens AGM, van Oort ELF, *et al.* : Sequencing-based typing reveals new insight in HLA-DPA1 polymorphism. *Tissue Antigens* **45** : 57 - 62, 1995.
- 8) Voorter CEM, Emonds M-P, van den Berg-Looen : Identification of a new DRB4 allele (DRB4* 0105) by sequence-based typing. *Tissue Antigens* **49** : 662 - 664, 1997.
- 9) Voorter CEM, Kik MC, van den Berg-Looen : High-resolution HLA typing for the DQB1 gene by sequence-based typing. *Tissue Antigens* **51** : 80 - 87, 1998.

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 クラス遺伝子のアレルタイプを表 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レ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レ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 13. 各施設でタイプされた HLA-DRB1 アリルの一覧

#	#1001		#1002	#1003	#1004	#1005	#1006	Method (1)		Method (2)		Method (3)	
	*1602	*1601	*1302	*0405	*1401	*0401	*0301	MPH	DR typing	DR3/11/3/14	DR typing	DR typing	DR typing
1	*1715	*1602	*1302	*0405	*1401	*0401	*0301	MPH	DR typing	MPH	DR typing	DR typing	DR typing
2	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR typing	RFLP	DR typing	RFLP	DR typing
3	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	MPH	DR typing	MPH	DR typing	RFLP	DR typing
4	*115	*16	*13	*0405	*14	*04	*03	SSP	DR low resolution	SSP	DR low resolution	SSP	DR low resolution
5	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	MPH	DR typing
6	*1502	*1602	*1302	*0405/10	*1401	*0401	*0301	SSP	DR high resolution	SSP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
7	*1502	*1602	*1302	*0403/7	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
8	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
9	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
10	*1501/1	*1601/1	*1302	*0405	*1401	*0401	*0301	MPH	DR typing	MPH	DR typing	MPH	DR typing
11	*115	*16	*13	*0405	*14	*04	*03	SSP	DR low resolution	SSP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
12	*115	*16	*13	*0405	*14	*04	*03	SSP	DR low resolution	SSP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
13	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
14	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
15	*1501/2	*1602	*1301/2	*0403/7	*1401/7	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
16	*1501/2	*1602	*1302	*0405/10	*1401/2	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
17	*1502	*1601	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
18	*02	*13	*13	*04	*14	*04	*03	rSSO	Amplicolor DRB	rSSO	Amplicolor DRB	rSSO	Amplicolor DRB
19	*15	*16	*13	*04	*14	*04	*03	rSSO	Amplicolor DRB	rSSO	Amplicolor DRB	rSSO	Amplicolor DRB
20	*1501/1	*1601/1	*1301/1	*0403	*1401	*0401	*0301	SSP	Micro SSP	SSP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
21	*115	*16	*13	*0405	*14	*04	*03	SSP	DR low resolution	SSP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
22	*1502	*1602	*1302	*0403/7	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
23	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
24	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
25	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
26	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
27	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
28	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
29	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
30	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
31	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
32	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
33	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
34	*1502/1	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
35	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
36	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
37	*115	*16	*13	*04	*14	*04	*03	SSP	DR high resolution	SSP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
38	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
39	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
40	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
41	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
42	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
43	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
44	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
45	*1502	*1602	*1302	*0403/7	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
46	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
47	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
48	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
49	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
50	*1502	*1602	*1302	*0403/7/6	*1401/10/11	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
51	*1502	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
52	*1502/1	*1602	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
53	*1502	*1602	*1302	*0403/7	*1401	*0401	*0301	RFLP	DR high resolution	RFLP	DR high resolution	rSSO	Amplicolor DRB
54	*1502	*1602	*1301/2	*0403	*1401/2	*0401	*0301	RFLP	DR low resolution	RFLP	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB
55	*1502	*1601	*1302	*0403	*1401	*0401	*0301	ELPHA	DR low resolution	ELPHA	DR low resolution	rSSO	Amplicolor DRB

*: ミスタイプ

xxxxx: 表記ミス

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															
14															
15															
16															
17															
18															
19															
20															
21															
22															
23															
24															
25															
26															
27															
28															
29															
30															
31															
32															
33															
34															
35															
36															
37															
38															
39															
40															
41															
42															
43															
44															
45															
46															
47															
48															
49															
50															
51															
52															
53															
54															
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		*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
 *xxxxy/ : 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	*0601	*0302	*0603	*0302	*0603	*0302	*0201	*0604				
1	*0502	*0601											MPH DQ typing		
2	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP		
3													スマイテスト		
4															
5															
6															
7	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		rSSO INNO-LJPA DOB	RFLP	
8	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		Immogenetics		
9	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		Immogenetics		
10													スマイテスト		
11													DR allele typing		
12															
13															
14	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		スマイテスト		
15													住友金属		
16															
17															
18															
19	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		Micro SSP		
20													One Lambda		
21															
22	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP		
23															
24	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP		
25	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201/2	*0604		rSSO INNO-LJPA DOB	SSCP	
26	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP	SSCP	
27															
28	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		rSSO INNO-LJPA DOB	SSP	
29	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP		
30															
31	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		SSO	SSP	
32	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP	DOB low resolution	Dynal
33	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP	DOB low resolution	Dynal
34	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		rSSO INNO-LJPA DOB	SSCP	
35													SSO		
36	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201/2	*0604		rSSO INNO-LJPA DOB		rSSO INNO-LJPA DOB Immogenetics
37															
38	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP		
39	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		SSO		
40	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP		
41	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP		
42															
43	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP		
44	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP		
45	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		rSSO INNO-LJPA DOB	Immogenetics	
46	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		SSP	DOB low resolution	Dynal
47	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		MPH DR allele typing		湧水製薬
48															
49	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP	SBT	
50	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP		
51	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201	*0604		RFLP	DOB1-SSP 1st & 2nd	Dynal
52	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201/2	*0604		RFLP	SSCP	
53	*0502	*0601	*0604		*0302	*0603		*0603		*0201/2	*0604		rSSO INNO-LJPA DOB	SSCP	
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		
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	0	1		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	0	4		0	0	9	0.81%
タイプされなかったアレル数	4	1	0	0	0	2	0	0	0		0	0	7	0.63%
間違えの合計数	6	4	5	0	1	5	0	2	7		0	0	30	2.70%
表記ミスによる間違え	0	4	0	0	1	0	0	4	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	0	1		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	0	1		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	*47	*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。

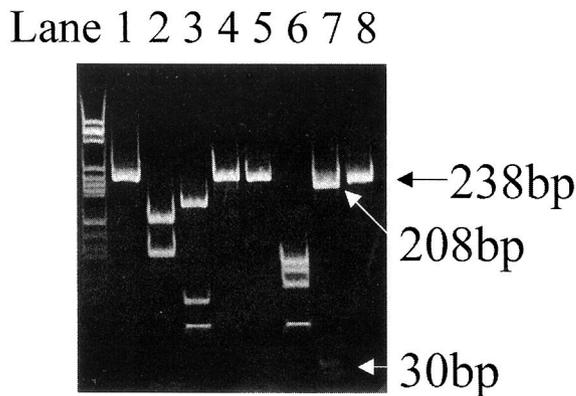


図1 RFLP 法によるミスタイプ例
Lane 7 NlaIII
実際のタイプ B*4002 (208, 30 bp)
ミスタイプ B*4006 (238 bp)

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

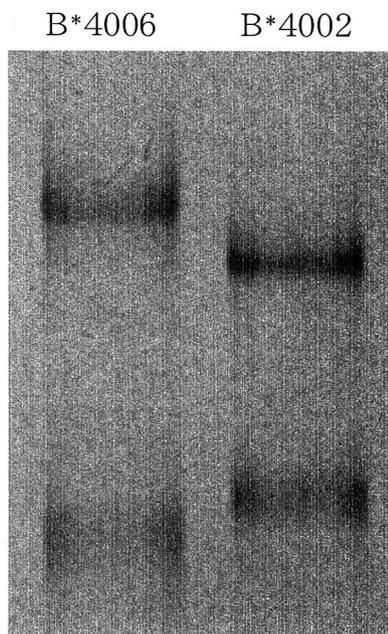


図2 SSCP 法による B*4002 と B*4006 との判別
泳動条件 10%アクリルアミド 22℃

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, -

〔国際学会印象記〕 第12回ヨーロッパ組織適合性学会 (EFI) 印象記

佐田 正晴

国立循環器病センター研究所, 実験治療開発部

第12回ヨーロッパ組織適合性学会 (EFI) は早春の3月25日から27日の3日間, ドイツ国境に近いフランス・ストラスブール市で開催された。ストラスブール市はアルザス地方最大の町で EU 会議場が置かれヨーロッパの中心地として知られているが, ワインやフォアグラをはじめグルメ垂涎の地でもある。学会は4つの plenary session, I: HLA, sequence, structure, function, II: Transplantation, III: MHC expression, regulation in health and diseases, IV: Gene manipulation and immune function, 5つの Teachingsession および6つの Abstract session より構成され各セッション共に活発な討論がなされた。今回の学会で印象に残った幾つかの発表を紹介しようと思う。

今年の Ceppellini lecture は「移植片拒絶における液性免疫」と題して P.I.Terasaki 教授が行った。最初に30年間にわたって蓄積された死体腎移植における PRA, direct crossmatch と移植成績と意義についてのレビューを行い, 最近の知見について言及した。最近10年間の著しい移植成績の向上は, 特異的免疫抑制剤であるサイクロスポリンの導入, crossmatch 法の改良と共に移植医の crossmatch に対する認識と価値観の変化に負うところが大きいことを強調した。欧米では従来から行われてきた LCT による PRA, crossmatch から抗体検出感度のより高い flow cytometry に移行することにより生着率を著しく向上させてきた。Flow cytometry による negative crossmatch あるいは negative PRA のレシピエントに移植することで2次移植が大幅に減少し, その結果ドナー臓器の有効利用にも一役買っている。

次に Terasaki は最近アメリカで施行されている夫婦間移植を含む非血縁生体腎移植1000症例の解析を行い, 2 haplo-mismatch 群と1 haplo-mismatch 群との間で1年生着に差を認めない事を報告した。一方, 死体腎移植に関しては ABDR 0-mismatch 群で1年生着が73%あるのに対し6-mismatch 群では56%と有意に低く, また生着しなかった移植症例ではドナーの年齢が高い(45才以上)傾向が強いことが解析結果から明らかになった。HLA 適合度の良否と共にドナーの年齢や PRA の陽性率が移植成績に強く反映されることを示した。最後に長期生着を達成するために ELISA や flow cytometry を用いレシピエント血清中の PRA や抗ドナー抗原特異抗体のモニターリングが最も重要であることを強調した。

臓器移植に関しては, Opelz が世界300施設より集計された最新の CTS データを紹介した。死体腎移植では DR 抗原の適合度が短期, 長期生着率に強く反映され ABDR 全てを含んだ適合度の検討では1年, 5年生着共に0~2-mismatch 群と比較し3~6-mismatch 群に著しい生着率の低下を認めた。同様の傾向は心, 肺, 膵移植でも認められたが肝移植では HLA 適合度と生着率に相関を見いだせなかった。肝移植でよく認められるマイクロキメリズム成立機構については HLA-mismatched antigen に依るところが大きいと考えられ今後の詳細な解析が望まれる。DP 抗原適合度に関しては2次移植や PRA 陽性のレシピエントで生着率に有意差を認め DP 抗原の有効性が明らかにされた。

骨髄移植に関しては、Hansen が Seattle Transplantation Group の解析データを紹介した。血清学的タイピングにより ABCDR が一致した 449 症例について DNA タイピングを再施行した結果、ABC で少なくとも 1 つ以上の相違が 35 % に、DR/DQ に関しては 25 % の相違が認められた。クラス I 抗原、特に C-mismatch により移植片廃絶率は増加するが DRB1 / DQB1 allele-mismatch が grade III, IV の GVHD を増加させることを示し、世界規模で骨髄移植を行う際、DNA タイピングを用いた正確な allele の決定と管理や免疫抑制プロトコールの標準化の必要性を強調した。

他の骨髄移植関係では死体腎移植と同様に、permissible mismatch の存在を示唆する発表が行われた。1 つは DP-mismatched pair を用いた MLC 解析から tolerable DP allele 存在の可能性と、移植前の HTLp-f (helper T ly. precursor frequency), CTLp-f (cytotoxic T Ly. pf) を用いた解析でクラス I, II-mismatch では TLp-f が高頻度であるにも関わらず A 1 / A 11, B 17 / B 14, Cw 6 / Cw 8-mismatch では陰性でこれら mismatch は permissible と考えられ、GVHD の予測にとっても重要であることが示唆された。骨髄移植ではクラス I 抗原の “blank” がしばしば問題となるが今回の発表でも血清学的に “blank” と判定され不幸な予後に陥った症例が報告された。これら症例では術前の CTLp-f で陰性と判定され移植されたが grade IV の GVHD により死亡した。CTLp-f テストでは “blank” 抗原の mRNA 量が少なかったため認識されず陰性と判定され移植後、強烈な CTL による抗原認識により GVHD が惹起されたと考えられクラス I の DNA タイピングの必要性が示された。今回の学会で欧米では移植分野へのクラス I DNA タイピング導入が急速に行われより正確な型合わせが日常化しつつある印象を強く持った。

HLA の構造と機能については DP のセントロメア側に規定された Ig の superfamily でクラス I 抗原の発現、TAP とクラス I の橋渡しをしている Tapsin や TAP とクラス I 分子の interaction についての報告、dendritic cell による MHC-peptide の認識

機構モデルや NK cell receptor によるクラス I 分子の認識仮説など興味深い発表が行われた。疾患感受性については transgenic mouse や knockout mouse を用いた疾患モデルと原因遺伝子の追求や、microsatellite の多型性解析をはじめ HLA 周辺遺伝子の解析が進み幾つかの疾患発症遺伝子が同定されつつある。

EFI は今まで日本からの参加者が殆ど無く寂しい限りであったが今回は多くの日本人が参加し昼夜を問わず楽しい学会となった。第 13 回 EFI は来春、クレタ島で開催される。

〔国際学会印象記〕 第 17 回国際移植学会に参加して

小林 孝彰

名古屋大学医学部, 第二外科

平成 10 年 7 月 12 日から 17 日まで、カナダのモントリオールで開催された第 17 回国際移植学会に出席しました。到着した日（7 月 12 日）はワールドカップ決勝戦でフランスがブラジルを破った直後ということもあって、街では車に乗った若者がフランスやブラジルの国旗を振り回して大騒ぎをしていました。乗り継ぎのバンクーバーでは、ワールドカップなど皆関心がないようであったのと比較すると、モントリオールはフランスの強い影響を受けていると感じました。街並みもどことなくフランスを感じさせるものがありました。案内表示や看板もフランス語と英語の両方でしたし、街の多くの人たちは、フランス語で話していました。しかし、当然彼らは、フランス語と英語のバイリンガルであり、こちらが、英語で話すと流暢な英語が返ってきます。暑い日本を飛び出し、日本よりも随分北に位置するモントリオールで涼しさを期待しましたが、強烈な陽射しのもと連日 33～34 度となり、避暑気分では出かけたのは大間違いでした。

学会では約 4000 人の参加があり、(a) 心・肺、(b) 腎、(c) 肝・小腸、(d) 膵臓・ラ島、(e) 細胞移植、(f) 人工臓器、(g) 骨髄、(h) 組織適合性抗原・免疫遺伝学、(i) 免疫生物学、(j) 移植実験、(k) 異種移植、(l) 臓器摘出、保存、(m) 免疫抑制（臨床）、(n) 免疫抑制（実験）、(o) 感染症・悪性腫瘍・長期合併症、(p) 倫理・経済・QOL (Quality of Life) のカテゴリーに分けて研究発表、討論が行われました。plenary session は 5 つのテーマで 20 題、symposium が 160 題、一般の口演発表は 363 題、ポスター発表は 723 題でした。一部のポスター発表には、ポスター会場と昼食会場をテレビ回線できなげ、スクリーン上で討論を行うという新企画がありました。昼食時に行ったため皆の興味は食事と

談話に移ってしまい、はっきり言ってこれは企画倒れでした。また、大多数のポスター発表には、今までのような特定の時間を設けて発表、討論する機会は与えられなかったため、ポスターを掲示しない（不参加）演題も少なからず見受けられました。学会は最終日を除いて、毎朝 7 時 15 分から国際学会ではお馴染みの早朝シンポジウムとそれに引き続き plenary session がありました。11 時頃から、一般演題の発表が行われました。時差ボケで眠ったのですが、朝食目当てで（といってもパンと飲み物だけです）早朝から出席し、何とか皆勤しました。

plenary session は教育講演的な内容がほとんどであり、「T cell activation」のテーマでは、MHC の構造と機能、T 細胞の signal transduction pathway についての講演がありました。その他に、「Molecular Modeling and Drug Design」、「Genes Transgenics Therapy and Tolerance」、「Organ Bridges and Bioartificial Device」、「Contemporary Issues in Xenotransplantation」の計 5 つのテーマで講演が行われました。Symposium も、ほとんどが教育的内容であり、「New Approach in Transplantation」のテーマでは、シクロスポリン、タクロリムス以後の新しい免疫抑制剤について解説がありました。とくに mycophenolate mofetil (MMF)、anti-CD 25 (interleukin-2 receptor α chain) monoclonal antibody (basiliximab, daclizumab の 2 種類あります)、rapamycin などについては、一般演題で数多くの臨床例が報告され、良好な結果が示されました。さらに、将来有望な薬剤として、FTY-20, ICAM-1 antisense oligonucleotide, anti-LFA-1 monoclonal antibody, CTLA 4-Ig, anti-CD 40 ligand monoclonal antibody などを使用した動物実験例も多数報告されていました。

異種移植の symposium では、超急性拒絶反応に

関与する抗 α Gal, IgM 抗体以外にも, 抗 α Gal, IgG 抗体がその後の細胞性拒絶反応や慢性拒絶反応に重要な役割を果たすことから, ドナー臓器の完全なる α Gal 抗原除去が必要であることや, 超急性拒絶反応を回避した後の acute vascular rejection での血管内皮細胞, サイトカイン, 凝固系活性化について講演がありました. また, 異種移植後の長期生着 (accommodation による) にレシピエント側因子として, Th 1 (T helper 1) から Th 2 サイトカインにシフトすることと, ドナー側因子として, protective 遺伝子である heme oxygenase-1 (HO-1) や抗アポトーシス遺伝子である A 20, Bcl-2, Bcl-XL 発現が重要であるとの話しがありました, これらも, 教科書的な発表にとどまり, 新しい情報は得られませんでした. 一般演題では, human decay accelerating factor (hDAF: 補体制御因子の一つ) 遺伝子を導入したトランスジェニックブタの新しい結果が報告され, ブタからヒヒへの異所性心移植で 99 日, サルへの腎移植で 78 日の生着が得られたとのことでした. しかし, 彼らのコントロール (遺伝子導入していない) ブタでも数日以上以上の生着が多数みられ, 我々の行ったブタからヒヒへの結果 (30 分から 1 時間で超急性拒絶反応がおきる) とは, 随分と差があるようでした. 彼らの使用している系のブタは α Gal 抗原の発現が少ないのでは?とも推測されますが, 詳細は不明です.

期待して出席した異種移植のセッションですが, α Gal 抗原を修飾 (減少) した遺伝子改変ブタの作出成功というようなブレークスルーとなる発表がなかったのは残念でした.

その他では, ブタの内在性レトロウイルス (porcine endogenous retrovirus: PoERV) のヒトへの感染性の問題や, 規制やガイドラインの必要性について話題となっていました. まだ少数例ですが, ブタの臓器灌流, 移植後に実際にヒトへ感染したという報告はありませんでした. 現在, 160 例以上のこのようなヒト血清を集め, PoERV の感染の有無について検査しているところです. また, アメリカでは, FDA によりストップしていた異種移植の臨床応用が, ブタの体外灌流 (肝臓を肝不全患者に用いる) に限って, その 2 週前に許可がおりたという

ことを参加者から聞きました. ウイルス感染の問題が解決されれば, 近い内に異種移植が行われると思います.

組織適合性抗原・免疫遺伝学のセッションでは symposium がわずか 4 題, 一般演題としてポスター発表が 21 題だけでした. symposium は「Impact of New Technology」のテーマで, すべて総論的な発表でした. スウェーデンの O.Olerup は, 血清学と遺伝子レベルの HLA タイピングを比較し, PCR による SSOP (classical, reverse), SSP, SBT などの方法が血清学に置き換わり HLA クラス I, II タイピングの主流となることを, ドイツの G.Opelz は, 免疫抑制療法の進歩により腎移植臨床例での HLA 適合効果は少なくなっているという考えに反対し, HLA タイピングの意義について強く主張しました. フランスの E.D.Carosella は HLA-G 発現が NK 細胞の攻撃を回避し, NK inhibitory receptor の ligand であると推測しました. これについては, 私共も胎盤のトロフォブラストに発現する HLA-G は母体の NK 細胞の攻撃を防ぐ役割があることに着目し, 異種移植において HLA-G 遺伝子を異種臓器に導入することが有用でないかと考えていました. 異種移植後の拒絶反応で超急性拒絶反応を回避した後生じる遅延型拒絶反応に NK 細胞が関与するからです. しかし, この学会 (5月に行われた ASTP: American Society of Transplant Physicians の学会でも発表された) でアメリカ, セントルイスのグループが HLA-G 遺伝子をブタ血管内皮細胞に導入することによりヒト NK 細胞による細胞傷害を阻害するというきれいなデータを発表したのを聞き, どこでも考えることは同じであり, 競争の激しさを感じました. ポスター発表では, フローサイトメトリークロスマッチについての発表が目立ちました. また, Opelz らは, アメリカで提唱された CREG (cross reactive group) matching に基づいてヨーロッパの腎移植例を検討した結果, CREG 適合よりも従来の HLA-A, B, DR 適合の影響がより強く, CREG matching の意義を疑問視する報告をしていました. 会議以外では, ネオゴシック様式で荘厳な趣のある北米最大級のノートルダム教会でモントリオールシンフォニーオーケストラによるコンサートがあり, 最終日前夜

には Windsor Station でガラパーティーが盛大に行われました。

この国際移植学会は、移植に関連する分野を全て含むため、一般の口演発表で8～9のセッションが並行して行われるくらい多くの発表があり、当然、すべてに出席することができません。むしろ、テーマを絞った小さい学会の方が、発表に興味をもって、白熱した討論が期待できます。このような大きな学会では、全体の大きな流れ、移植医療の動向をつかむのにはよいかもかもしれませんが、分野別では、目新しい発表は少ないようでした。日本からは、いつもながら多くの出席者がありましたが、世界から見れば、(生体肝移植を除き)日本は移植医療の developing country として位置づけられ、臨床に関連した発表ができない分、口演発表は多くありませんでした。同じアジアでも、韓国、台湾、タイ、中国、インドは着実に移植数を増やし、日本との差は広がる一方です。

また、ドナー不足を解決する方法として動物(ブタ)の臓器を利用する異種移植の研究は、世界で精力的に進められ臨床試験が始まろうとしています。日本でも、異種移植研究は活発に行われていますが、

写真1 学会会場である Palais des Congrès (Montreal Convention Centre)



移植医療の発展なくしては、実現不可能であろうと思います。脳死移植が認められたにもかかわらず、まだ移植がおこなわれない現状を打破し、早く臨床を軌道にのせなければならぬと痛感しています。

平成11年10月24日から28日まで名古屋国際会議場で第5回国際異種移植学会(会長:高木弘)が開催されます。興味のある方は、是非ご出席くださいますようお願い致します。皆様のご参加をお待ちしております。



写真2 学会のひとつとき、左より Dr. Cooper (アメリカ)、筆者、Dr. d'Apice (オーストラリア)、Dr. Friend (イギリス)、Dr. Sandrin (オーストラリア)、Dr. Luo (カナダ)

Q & A

小林 賢

防衛医科大学校, 検査部

Q 私たちの施設にはパーキンエルマー社の 9600 でない PCR 装置しかありませんが、キットに添付されている増幅条件で検査することができますか。

A 私たちの研究室では、アステック社製の PC-800 を使用して、DYNAL や One Lambda 社の SSP キットでタイピングを行っていますが、まったく問題なく検査できています。ただし、増幅に使用するマイクロチューブは、0.2 ml でないと条件が異なります。この装置は、通常 0.5 ml チューブ用のヘッドが装着されています。0.2 ml 用のヘッドはオプションで市販していますので、これを購入してヘッド交換してから増幅を行ってください。また、増幅はパーキンエルマー社の AmpliTaq Gold を使用して、各社が推奨している条件にしたがって行っています。ただし、AmpliTaq Gold の能書には「通常の

増幅回数よりも 5 から 10 回多くしてください」ということが書かれていますが、プライマーによっては擬陽性に出ることがありますので、タイピングキットの能書の通りの増幅回数で行った方が良い結果が得られると思います。Taq DNA polymerase は、AmpliTaq でも問題なくタイピングを行うことができます。その他の増幅装置を使用した経験がないので正しいことは言えませんが、おそらく 0.2 ml チューブが利用できれば、同じ条件で増幅できると思います。上記以外のタイピングキットについては、ロシュ社の Amplicor、BioTest 社の ELPHA や湧永製薬の MPH 法でも問題なく検査することができます。私たちは、INNOLiPA を使用した経験がありませんが、おそらく問題なくタイピングを行うことができると思います。

第 15 回 近畿 HLA 研究会

会 期 : 1998 年 2 月 7 日 (土)
 会 場 : 三和化学研究所 大阪メディカルホール 5F 会議場
 世話人 : 村田 紀和
 国立大阪南病院整形外科

一般演題

1. 慢性関節リウマチ患者に対する HLA-DRB1 遺伝子型から予測される手術療法

¹⁾ 戸田整形外科リウマチ科クリニック, ²⁾ 関西医科大学整形外科

戸田 佳孝¹⁾, 竹村 清介²⁾

要約

【目的】慢性関節リウマチ (以下、RA) 患者が膝関節の滑膜切除術, および人工関節置換術 (以下、TKA) を必要とする可能性の高い罹患年数を HLA-DRB1 遺伝子型から予測する。

【対象および方法】対象は RA 因子陽性の RA 患者 264 名である。平均罹患年数は 9.2 年であった。HLA-DRB1 遺伝子分類は、PCR-SSO 法で行った。その結果、ホモ接合体である症例を S/S 群, ヘテロ接合体を S/N 群, 感受性遺伝子を有しない症例を N/N 群と分類した。評価項目は、既往歴に膝関節滑膜切除術および TKA を受けた症例について、手術施行時の罹患年数を調査し、各遺伝子群別に比較した。

【結果】S/S 群の中で滑膜切除術を受けた患者は open synovectomy 4 例, 鏡視下 4 例の計 8 例 (15.1%) であった。S/N 群では open synovectomy 6 例, 鏡視下 4 例の計 10 例 (9.8%), N/N 群では open synovectomy 5 例, 鏡視下 5 例の計 10 例 (9.1%) が滑膜切除術を受けていた。TKA についても、S/S 群の 9 例 (17.0%), S/N 群の 17 例 (16.7%), N/N 群の 22 例 (20%) がこの手術を受けていた。滑膜切除群でも TKA 群でも手術を受けた患者の割合は 3 群間で有意差はなかった。滑膜切除術施行時の平均罹患年数は、S/S 群で 5.8 年, S/N 群で 6.3 年, N/N 群で 8.4 年と、3 群間で有意差はなかった。しかし、TKA を施行した平均罹患年数は、S/S 群で 5.2 年, S/N 群で 9.4 年, N/N 群では 12.6 年と、S/S 群では他の群に比べて、有意差が観察された。

【結論】本研究の結果から、我々は S/S 群の症例に臨床上 TKA を施行する適応が生じた場合には、時期を逃さず、TKA に踏み切るべきではないかと、結論した。

はじめに

過去に我々は、今回、慢性関節リウマチ (以下、RA) の中で両方の対立遺伝子に susceptible allele を有する患者では、それを一方の対立遺伝子のみ有す

る患者やそれを全く有しない患者に比べて骨破壊進行度が急速であると報告した(1)。

今回はこの遺伝子診断法が外科的な治療法の選択に応用可能であるか否かを検証する目的で、RA 患

者の膝関節の滑膜切除術および人工関節全置換術(以下, TKA)を必要とする可能性の高い罹患年数を HLA-DRB1 遺伝子型から予測する試みを retrospective に行った。

対象および方法

対象は, RA 因子陽性で 1987 年のアメリカリウマチ学会の診断基準を満たした RA 患者 264 名である(2)。HLA-DRB1 遺伝子検査は, 1995 年以前はシオノギバイオメディカル社に依頼し PCR-SSO 法を用いて, 1996 年以降は自己の研究室内で PCR-RFLP 法で行った(3)。

その結果, 脇谷らが RA 群で健常人より有意に高率である事を報告している HLA-DRB1*0405 および 0101 を susceptible alleles とし, それらの遺伝子のホモ接合体である症例を S/S 群 (0405 / 0405, 0405 / 0101, 0101 / 0101), ヘテロ接合体で

ある症例を S/N 群, susceptible alleles を有しない症例を N/N 群と分類した(4)。

264 例の膝関節の単純 X 線写真を Larsen の stage 分類を用いて, 6 段階に分類し, 各 stage に至る平均の罹患年数を S/S, S/N, N/N 群で比較した(5)。また, 3 群間で TKA や滑膜切除術を行った症例の割合やその平均罹患年数を比較した。

統計学的有意差検定には Mann-Whitney の U test を用いた(6)。

結果

264 例中, S/S 群は 52 例, S/N 群は 134 例, N/N 群は 78 例であった。中央値を用いた差の検定では 3 群間で性の分布, 年齢, 罹患年数, リウマチ因子ならびに CRP 値に有意差はなかった (P> 0.05), (Table 1)。

各 stage に至る罹患年数の中央値は, 例えば stage

Table 1. Patients characteristics and activities of inflammatory in each genotype

	Sex		Age		RA duration		CRP (mg/dl)		RAF (ID/dl)		Joint count *	
	male	female	mean	median	mean	median	mean	median	mean	median	mean	median
Total (n = 264)	47	216	55.9	56	9.2	9.0	3.6	1.5	217.8	56.2	39.6	28
S/S (n = 52)	11	41	56.3	56	8.7	8.0	4.7	3.8	256.2	62.4	56.7	40
S/n (n = 134)	25	109	56.4	56	9.8	9.0	3.3	1.9	219.5	57.3	37.2	27
N/N (n = 78)	12	66	54.9	57	8.4	8.5	2.2	0.6	189.4	52.4	32.3	18

Table 2. The distribution of the stage in each genotype

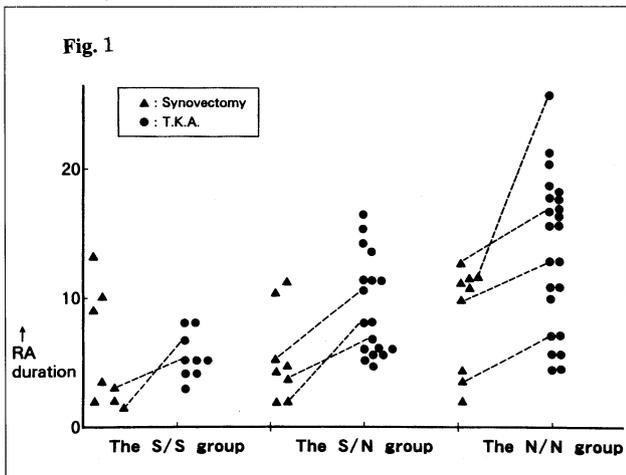
	n	stage 0			stage I			stage II			stage III			stage IV			stage V		
		(cases)	median (years)	mean (years)	n (cases)	median (years)	mean (years)	n (cases)	median (years)	mean (years)	n (cases)	median (years)	mean (years)	n (cases)	median (years)	mean (years)	n (cases)	median (years)	mean (years)
all (n = 264)	27	1.0	1.7	94	3.0	6.0	52	5.0	7.9	23	12.0	12.6	57	16.0	14.6	10	24.5	26.0	
The S/S group (n = 52)	3	1.0	1.0	7	1.0	2.4	14	3.0	3.9	6	6.0	6.6	16	8.5	11.4	6	22.0	26.2	
The S/N group (n = 134)	9	1.0	1.2	52	3.0	6.1	28	5.5	8.9	10	10.0	17.0	30	17.5	15.5	4	24.0	22.3	
The N/N group (n = 78)	15	1.0	2.1	35	6.0	6.5	10	10.0	10.5	6	12.0	10.6	11	20.0	16.8	0	-	-	

IIはS/S群では3年であるのに対して、S/N群では5.5年、N/N群では10年と、S/S群ではS/N群やN/N群に比べて有意に短期であった(P<0.05)。同様の有意差はstage I, III, IVでも観察されたが、stage Vの場合、N/N群に属する症例が皆無であったため、有意な検定が行えなかった(Table 2)。

TKAを過去に受けた症例の割合はS/S群で15.7%、S/N群で18.8%、N/N群で10.2%であり、Mann-WhitneyのU-testでは3群間で有意差は観察されなかった。同じく、滑膜切除術(Synovectomy)を受けた患者の割合にも有意差はなかった。

滑膜切除術が施行された時の患者の平均罹患年数についてもS/S群では8.1年、S/N群では5.4年、N/N群では6.2年と3群間で有意差はなかった。

しかし、TKAを施行した平均罹患年数は、S/S群で5.2年、S/N群で9.4年、N/N群では12.6年と、S/S群では他の群に比べて、有意にTKA施行時罹患年数が短期であった(Fig. 1)。



考察

近年、人工関節の材質の発達によって、その耐久年数が伸びている。

Scuderiらによるとセメントを用いたTKAを施行した患者では術後12年以上経過しても優秀な治療成績を維持していたと、報告している(7)。

しかし、TKAは、患者にとってもそれを施行する医師にとってもRAの骨破壊進行の最終段階に行

うべき手術である事には、現在も変わりがなく、この手術を予防的に行う事は少ない。このため、今回の結果でも急速にRAの骨破壊が最終段階に達すると考えられるS/S群では、他の群に比べてTKAを施行した罹患年数が短期であった。

一方、RAに対する膝関節滑膜切除術の意義については、疼痛を抑制する効果が主であり、RA骨破壊進行に対する影響は明白ではないという意見が多数である(8~11)。従って、今回対象とした症例でも如何なるRAの骨破壊時期に滑膜切除術を行ったかは、各症例の経過およびそれを施行した施設により異なっていたと、予測される。そのため、TKAとは異なり、滑膜切除術を施行した症例数およびその時期とHLA-DRB1遺伝子型との関連性が明白とならなかったのではないかと、我々は考察した。

TKAを施行するべきタイミングを見きわめる事は非常に重要であり、その時期を逃すと、隣接関節の骨破壊が重症化しやすい。

Fig. 2



本研究の結果から、我々は S/S 群の症例に臨床
上 TKA を施行する適応が生じた場合には、時期を
逃さず、TKA に踏み切るべきであるとの、結論を
出した。

職人的要素の強い骨関節の外科治療の分野では、
遺伝子検査は一般に理解できない、また理解する気
もない存在として敬遠する医師が多い。しかし、今
後更に研究を進める事によって、遺伝子検査が適切
な時期に適切な手術を行う診断法の一つとして確立
される事を著者は(密かに)期待している (Fig. 2)。

参考文献

1. Toda Y, Minamikawa Y, Akagi S, *et al.* : Rheumatoid-susceptible alleles of HLA-DRB1 are genetically recessive to non-susceptible alleles in the progression of bone destruction in the wrist and fingers of patients with RA. *Ann. Rheum. Dis.* **53** : 587 - 592, 1994.
2. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, *et al.* : The American Rheumatism Association 1987. Revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31** : 315 - 324, 1988.
3. Kaneshige H, Murayama T, Hirasawa M, Sada H, Amemiya H, Uchida K : Rapid and practical HLA class II genotyping by reverse dot blotting. *Transplant. Proc.* **25** : 194 - 198, 1993.
4. Wakitani S, Murata N, Toda Y, *et al.* : The relationship between HLA-DRB1 alleles and disease subsets of rheumatoid arthritis in Japanese. *Br.J.of Rheumatol.* **630** - 636, 1997.
5. Larsen A, Dale K, Eek M : Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference film. *Acta. Radiol. Dian.* **18** : 481 - 491, 1977.
6. Peto R, Pike MC, Armitage NE : Design analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and examples. *Br. J. Cancer.* **35** : 1 - 39, 1977.
7. Scuderi GR, Insall JN, Windsor RE, Moran MC : Survivorship of cemented knee replacement. *J. Bone Joint Surg. [Br.]* **71** : 793 - 803, 1989.
8. Arthritis and Rheumatism Council and British Orthopaedic Association : Controlled trial of synovectomy of knee and metacarpophalangeal joint in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **35** : 437 - 442, 1976.
9. Arthritis Foundation Committee on Evaluation of synovectomy : Multicenter evaluation of synovectomy in treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **20** : 765 - 71, 1977.
10. Ochi T, Iwase R, Kimura T : Effect of early synovectomy on course of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol* **18** : 1794 - 98, 1991.
11. Tillmann K : Recent advances in the surgical treatment of rheumatoid arthritis. *Clin. Orthop.* **258** : 62 - 72, 1990.

Relationship between the disease duration performing knee joint surgery and HLA-DRB1 genotypes in patients with rheumatoid arthritis Yoshitaka Toda¹⁾

Seisuke Takemura²⁾

1) Toda Orthopedic Rheumatology Clinic

2) Dept of Orthopedic Surgery, Kansai Medical University

Key words :

Rheumatoid arthritis, Immunogenetics, Orthopedic Surgery

一般演題

4. 抗リン脂質抗体と HLA class II Ag の疾患感受性に附いての検討

¹⁾ 関西医大・第1内科, ²⁾ 同・輸血部

尾崎 吉郎¹⁾, 松崎 龍典²⁾, 香川 英生¹⁾, 野村 昌作^{1,2)}, 福原 資郎¹⁾

LAC 陽性患者 35 例, β_2 GP-I 非依存性 IgG-aCL Ab 陽性患者 21 例, β_2 GP-I 依存性 IgG-aCL Ab 陽性患者 14 例に対して, PCR-RFLP 法により HLA-DRB1・DQB1 の genotyping を実施した。

HLA-DRB1 との関連では LAC と *0901・*0803, β_2 GP-I 非依存性及び依存性 IgG-aCL Ab と *0803 との間に有意な相関関係を認めた。DQB1 との関連では LAC と *0303・*0601 との間に有意な相関関係が観察された。また DRB1 *0901・*0803 の allele を保有する患者がそれぞれ “TRAE LDT” を含む DQB1 *0303・*0601 を同時に保有する率は各々の haplotype の出現率と比較しても高い傾向があった。

Arnett 等は, HLA DQB1 の 71 ~ 77 番目のシークエンスに “TRAE LDT” というアミノ酸配列を持つ allele 群が, LAC との間に疾患感受性を持つと報告しているが, 日本人集団でもこれが当てはまると考えられ, “TRAE LDT” を含む allele 群の中でも DQB1 *0601・*0303 に強い関連があると考えられた。

日本人集団では, DRB1 *0803 / DQB1 *0601・DRB1 *0901 / DQB1 *0303 はともに強い連鎖不平衡を持つが, 抗リン脂質抗体は同時にこれらの allele を持つ個人に出現頻度が高く, あるいはこのハプロタイプに疾患感受性があるとも考えられた。

一般演題

6. サルコイドーシスの病体と HLA DQB1 DPB1

大阪簡易保険総合健診センター, 大阪府赤十字血液センター

立花 暉夫, 石井 博之, 松山 宣樹, 大谷 智司, 永尾 暢夫

目的、対象、方法

立花が長期経過追求中のサルコイドーシス（以下サ）90 症例について、大阪府赤十字血液センターで、PCR-RFLP 法により、HLA-DPB1, DQB1 DNA Typing を実施し、得られた成績とサの病態との関連を、前回に続いて検討した。

(1) サの臨床経過との関連について。経過不良（初診後、5 年以上サ病変長期持続）病例と経過良好（初診後、2 年以内サ病変著明改善）症例について、HLA DRB1*0803-DQB1*0601 haplotype 頻度を比較検討した。なお、HLA DRB1*0803 および

HLA DQB1*0601 が経過不良例で経過良好例に比して高頻度な事は、立花が既に本研究会で報告した。

(2) サ経過不良と関連する ACE 遺伝子型（大阪大学老年病医学、檜垣他、Rigar 法で測定）DD, DI 陽性かつ上記 haplotype 陽性の頻度を上記 2 群で比較検討した。

(3) サの全身性病変の中で最も重要な心病変を有するサ症例（心サ症例）について HLA DQB1*0601 頻度を第 11 回日本 HLA Workshop で集計された健康人の成績と比較検討した。

(4) 英国サ症例で高頻度な、HLA DPB1 のアミノ酸 sequense 69 番目に Glutamine を有する (DP Glu 69) alleles の陽性頻度を、上記サ経過不良、良好 2 群で比較検討した。

結果

1. HLA DRB1* 0803 -DQB1* 0601 haplotype 頻度および、同 haplotype 陽性かつ ACE 遺伝子型 DD, DI 陽性の頻度は、サ経過不良群で高頻度であった。
2. HLA DQB1* 0601 は、心サ症例では、健康人対照に比して高頻度であった。
3. HLA DPB1 Glu 69 alleles 頻度は、サ経過不良、良好 2 群間で著差を認めなかった。

表 1. HLA DRB1* 0803 -DQB1* 0601 haplotype とサルコイドーシスの臨床経過

HLA DRB1* 0803 -DQB1* 0601 haplotype 頻度	
経過良好例 (N=21)	7.1 %
経過不良例 (N=25)	22.0 %

表 2. HLA DRB1* 0803 -DQB1* 0601 および ACE 遺伝子型 DD, DI 陽性とサルコイドーシスの臨床経過

HLA DRB1* 0803 -DQB1* 0601 & ACE 遺伝子型 DD, DI 陽性頻度	
経過良好症例 (N=30)	0 %
経過不良症例 (N=38)	26.3 %

表 3. HLA DQB1* 0601 とサルコイドーシス全身性病変

心サルコイドーシス症例 HLA DQB1* 0601	
(N=11)	63.6 %
健康人対照 (N=1216)	33.0 %
P=0.03	

表 4. HLA DPB1 Glu 69 とサルコイドーシスの臨床経過

HLA DPB1 Glu 69	
経過良好例 (N=23)	30.4 %
経過不良例 (N=27)	35.2 %

一般演題

8. MPHA 法のクロロキン処理による血小板上の MHC クラス I 抗原の不失活症例について

兵庫県赤十字血液センター¹⁾, 大阪府赤十字血液センター²⁾,
神戸市立中央市民病院免疫血液内科³⁾, 東京大学医学部附属病院輸血部⁴⁾

荒木 延夫¹⁾, 藤原 宝子¹⁾, 秋田 真哉¹⁾, 今栄 幸輝¹⁾, 合志 博司¹⁾,
能勢 義介¹⁾, 神前 昌敏¹⁾, 三戸 壽¹⁾, 谷上 純子²⁾, 永尾 暢夫²⁾,
平田 久美子³⁾, 石川 隆之³⁾, 柴田 洋一⁴⁾

目的

MPHA 法を用いて抗血小板特異抗体を検出する場合、血小板上の MHC クラス I 抗原を失活する目的としてクロロキン処理が一般的に使用されている。今回、我々はクロロキン処理後もクラス I 抗原が失活されずに残ったために抗血小板特異抗体と紛らわしい反応を示す症例に遭遇したので報告す

る。

症例

患者 OH は 39 才、MDS の男性で 50 単位以上の濃厚赤血球と血小板輸血により PTR に陥り、血清中に LCT 抗体価 256 ~ 4096 倍の抗 HLA 抗体 (multispecific) が検出された。また、MPHA 法を用

いてクロロキン処理パネル血小板で抗血小板特異抗体の存在を確認したところ、HPA-1~8, Nak^aそして, Va^a 抗原のいずれにも該当しない反応パターンを検出した(抗体価512倍)。また、患者血清を20種のプールリンパ球で吸収したところ、抗体価に変化は見られず未吸収の反応パターンと一致した。また、その患者血清の抗体価の推移は脾摘出前から摘出後49日までのLCT抗体価がほぼフラットなのに対し、MPHA法の抗体価は16倍に低下したことが観察された。以上のことから新たな特異性の抗血小板特異抗体と考えられたが、この抗体に反応する抗原頻度が40.1%にかかわらず、8名のHLA適合血小板ドナー〔LCT(-), AHG-LCT(-)〕と患者血清の反応がMPHA法ですべて陰性を示したことより、以下の精査を実施した。MPHA法で反応するパネルのリンパ球で患者血清(100倍希

釈済)を吸収したところ、MPHA法の反応性は消失した。また、MPHA法を用いて既知HLA抗原クロロキン処理血小板パネルで反応性を確認したところHLA-A11の特異性を示し、既知HLA抗原クロロキン処理血小板抽出抗原パネルでの結果はHLA-A11+A31の特異性を示した。

考察

本症例のように抗HLA抗体が抗血小板特異抗体と紛らわしい反応を示すことがあるので、抗血小板特異抗体スクリーニング用クロロキン処理パネルやpopulation studyパネルは既知HLA抗原パネルを用いることは必須であると考えられる。また、血小板上のHLA-A11抗原はクロロキンで失活されにくいと考えられるが更に検討が必要である。

一般演題

9. 血小板上のHLA-A11抗原のクロロキン処理による失活性について

兵庫県赤十字血液センター¹⁾, 京都大学医学部附属病院輸血部²⁾

荒木 延夫^{1,2)}, 秋田 真哉¹⁾, 藤原 宝子¹⁾, 今榮 幸輝¹⁾, 合志 博司¹⁾,
神前 昌敏¹⁾, 三戸 壽¹⁾, 伊藤 和彦²⁾

目的

MPHA法において抗HLA抗体と抗血小板特異抗体を鑑別する場合、血小板上のMHCクラスI抗原を失活する目的としてクロロキン処理が一般的に使用されている。既に、我々はクロロキン処理後もクラスI抗原が失活されずに残ったために抗血小板特異抗体と紛らわしい反応を示す症例を先の演題にて報告したが、その原因抗体は抗HLA-A11であった。そこで、同様のHLA特異性抗体例について検討したので報告する。

方法

MPHA法に用いるクロロキン処理血小板固相プレートは各穴に 5×10^6 コずつ血小板を固相後、

0.8Mのクロロキン溶液で22℃、一晩処理して作製した。MPHA法による抗体の検出方法は、血小板と抗血清の反応を22℃2時間行い、指示血球との反応は22℃、一晩で行った。抗血清は頻回血小板輸血患者の上記症例のOH(multispecific)そして、KT(A11+A26+A31+A33), AY(A11+A26+A33), US(A11+A31+A33)の4種、経産婦由来血清が37-308(A3+A11), 37-274(A1+A11+A26)の2種の計6種を用いた。

結果

抗 HLA-A 11 関連抗体の 5 法による抗体価測定

血清No.	LCT	抗体価 (倍)		MPHA 処理	
		AHG-LCT		未処理	処理
		κ	λ		
OH *	512	2048	2048	65536 ↑	陰性
OH**	4096	16384	16384	65536 ↑	512
KT**	陰性	64	32	not tested	1024
AY**	2	64	32	not tested	128
US**	4	8	16	8	陰性
37-308**	64	128	128	陰性	陰性
37-274**	4	16	16	8	陰性

血小板, リンパ球は同一ドナーを使用

(*: HLA-A 2, 24, B 35, B 59, Cw 1, Cw 9 ;

** : HLA-A 11, 24, B 62, B-, Cw 4, Cw 9 のパネル抗原を使用)

考察

HLA-A 11 関連抗体 6 種中 3 種がクロロキン処理 A 11 陽性血小板パネルに陽性を示し, 特に KT は LCT 陰性, AHG-LCT 64 倍の低力価抗体にかかわらず, MPFA 法で高力価を観察した. 血小板

上の A 11 抗原のエピトープはクロロキン処理で失活するものとされにくいものが存在し, また血小板上に発現していないものもあり, 今後の検討が必要であると考え.

一般演題

10. 羊水中の可溶性 HLA-G 抗原の検出

奈良県立医科大学法医学教室, Fred Hutchinson Cancer Research Center*

下嶋 典子, 石谷 昭子, 川崎 明彦, 安藤 稔, 増田 知恵子,
Daniel E. Geraghty*, 羽竹 勝彦

はじめに

HLA-G は, 蛋白としての発現が母体と胎児の接点である胎盤トロホプラストのみに発現され, 膜結合性抗原と可溶性抗原の 2 種が存在するという事は, これまでに報告してきた. HLA-G は胎児を母体の alloreaction から保護する役割を保っているものと推測され, HLA-G と妊娠中毒症 (preeclampsia) や習慣性流産との関連が注目されている. 最近, Fujii ら (Am J Reprod Immunol, 1996) は, 妊娠中毒症患者の extravillous trophoblast (cytotrophoblastic shell cells) において, 膜結合性 HLA-G 抗原の発現が低下しているという報告している. 我々は, 可溶性 HLA-G 抗原の発現と疾患の関連の検討を目的として, これら HLA-G に対する抗体, すなわち, 可溶性抗原のみと反応する抗体 (16 G 1), および膜

結合性抗原と可溶性抗原の両者に反応する抗体 (87 G) を作製し, これらを用いた sandwich ELISA により, 可溶性抗原を検出する方法を検討してきた. 今回, これを用いて羊水中に可溶性抗原を検出し得たので報告する.

方法

抗体の作製: 87 G については $\beta 2 m$ と HLA-G 遺伝子を導入したマウス細胞で HLA-B 57 transgenic mice を免疫し, 16 G 1 については, 可溶性抗原蛋白の C 末端に位置する 20 アミノ酸 (第 4 イントロン) の配列をもつペプチドを合成し, これに KLH を結合したもので BALB/c マウスを免疫し, 以下は定法に従って Hybridoma を作製し, 抗体を得た.

蛋白濃度の測定：Bio-Rad protein assay kit により測定した。

sandwich ELISA：可溶性抗原を認識する抗体 16 G1 あるいは 87 G をプレートと結合させた後、サンプルを反応させ、これをビオチン化した W6/32 (抗class I 抗体)、Streptavidin- β -Galactosidase Conjugate (GIBCO BRL)、4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside (Sigma) の検出系を用い、この蛍光を CytoFluorTM 2300 Fluorescence Measurement System で Ex/Em=360/460 により測定した。可溶性抗原の検量線は affinity 精製した可溶性抗原を用いて作製した。

サンプル：羊水は、19～38 週の羊水を 3000 g、10 分遠心し、その上清を用いた。サンプルは測定時まで、-80℃で凍結保存した。

結果

我々は、これまでに、可溶性 HLA-G 抗原の測定法の検討を重ね、妊婦血清中の可溶性抗原の測定を試みてきたが、いまだ成功し得ていない。これは、一つに血清中の何らかの反応阻害物質が存在するためか、あるいは妊婦血清中の可溶性抗原量が測定感度以下であるためか、明らかではない。今回、血清よりも蛋白量の少ない、羊水中の可溶性 HLA-G 抗原の測定を行った結果、羊水中に、可溶性抗原の存在は認められたが、全ての羊水サンプルから可溶性抗原が検出されたわけではなかった。今後さらに可溶性抗原の測定法の改良を重ねていくと共に、疾患と HLA-G の関連を検討していく予定である。

一般演題

11. HLA-G の多型性について

奈良県立医科大学法医学教室, 鹿児島大学医学部ウィルス学教室*

岸田 学, 石谷 昭子, 下嶋 典子, 増田 知恵子, 園田 俊郎*, 羽竹 勝彦

はじめに

HLA-G は HLA class Ib 遺伝子の一つであり、多型性が極めて乏しいことが知られている。HLA-G は蛋白質レベルの発現は人体組織中、胎児と母体の接点である胎盤トロホブラストにのみ見られることから、その機能は妊娠中の免疫機構に関連していると考えられ、注目されてきた。胎盤トロホブラストには、多型性に富む HLA-A,-B,-C (class I a) や DP,-DQ,-DR (class II) は発現しておらず、多型性の乏しい HLA-G のみが発現していると考えられている。母体の T 細胞, NK 細胞に接する胎児細胞のトロホブラストには多型性のほとんどない HLA-G のみが発現していることにより、母体免疫細胞はこれらの胎児細胞を“他”とは認識せず拒絶反応を起こさないと考えられている。山下らは日本人における HLA-G の多型を調べ、110 番目のアミノ酸 1ヶ所において Leu が Ile に変化した allele が約 40% 存

在するのみであると報告しており、上記の HLA-G の機能に関する推論を裏付けている。ところが近年、van der Ven と Ober は、African American においては、exon 3 において、24 種もの nonsynonymous な変異が存在すると報告した。もし、事実このように多型に富んでいるならば、どうして母体 T 細胞は、allo 反応を引き起こさないのだろうか。そこで我々は、この疑問を解くべく、彼らと同様に African American およびアフリカ人 (ガーナ) そして日本人について、HLA-G の多型性を再検討した。

方法および材料

日本人 34 名, アフリカ人 (ガーナ) 32 名, African American 38 名より得た genomic DNA について、HLA-G 遺伝子の exon 3 部分を PCR 増幅した。この時 primer は山下らおよび Ober らの用いたものと同じものを使用した。その PCR 産物を ABI

PRISM 310 Genetic Analyzer によって dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を使用し、Direct sequence を行った。

結果

結果は表に示すとおりである。日本人のサンプル

に関して、山下らの報告とほぼ同様の結果を得ることができた。アフリカ人と African American には 130 番目の codon に Cytosine 欠失があるが、日本人にはこの多型は見られない。African American はアフリカ人より多型の頻度は高いものの、Ober らの報告したような多型は検出されなかった。

Polymorphism				Frequency(%)		
allele	codon	nucleotide change	amino acid change	Japanese	African American	Ghana
*01011	—	—	—	39.7	69.8	84.3
*01012	93	CAC⇒CAT	—	16.2	6.6	1.6
*01013	107	GGA⇒GGT	—	5.9	2.6	0
*0104	110	CTC⇒ATC	Leu→Ile	38.2	11.8	7.8
*0105N	93	CAC⇒CAT	—	0	9.2	6.3
	130	CTG⇒__TG	frameshift			

Total number of samples is 34 for Japanese, 38 for African American and 32 for Ghana population.

一般演題

12. 近畿臍帯血バンクの現状

兵庫医科大学輸血部¹⁾, 奈良県立医科大学輸血部²⁾, 関西医科大学小児科³⁾, 京都府赤十字血液センター⁴⁾, 京都府立医科大学衛生学教室⁵⁾, 大阪府立母子保健医療センター⁶⁾, 大阪市立総合医療センター⁷⁾

谷脇 清助¹⁾, 前田 和宏¹⁾, 藤林 由佳¹⁾, 甲斐 俊朗¹⁾, 原 弘¹⁾, 下山 丈人²⁾, 藤村 吉博²⁾, 緒方 肇³⁾, 沖 学⁴⁾, 仁田 浩⁴⁾, 横山 繁樹⁴⁾, 園田 精昭⁵⁾, 河 敬世⁶⁾, 迫 正廣⁷⁾

目的

近年、小児を中心とした臍帯血中の造血幹細胞を用いた同胞間幹細胞移植が日本においても平成9年10月末現在、同胞間17例、非血縁者間9例の臍

帯血幹細胞移植が行われている。また近畿臍帯血バンクが平成7年11月に設立され、臍帯血中の幹細胞の保存が開始されたのでその現状と利用状況について報告する。

方法

近畿臍帯血バンクで採取，凍結保存が行われている施設は奈良県立医科大学輸血部，関西医科大学小児科，京都府赤十字血液センター，京都府立医科大学衛生学教室，兵庫医科大学輸血部の5施設と，その関連病院である。

結果

平成10年1月20日までに5施設で保存され近畿臍帯血バンクに登録されている臍帯血標本は272標本である。臍帯血標本のバンク登録には分娩情報，臍帯血情報，母体情報，新生児情報などが記録された臍帯血登録票，家族歴調査票，新生児の6か月調査票，同意書などが揃っており，正常な臍帯血標本に限られている。

凍結保存されている272標本の内容量は，採取量で74.5 ml（最少50～最大164 ml），有核細胞数は 7.25×10^8 （最小 $1.1 \sim$ 最大 26.4×10^8 ），また 10×10^8 以上の細胞数がある臍帯血標本は14%（39標本）にみられた。CFU-GMは 6.3×10^5 （最小 $0.5 \sim$ 最大 38.9×10^5 ），CD34陽性細胞は 33.4×10^5 （最小 $1.1 \sim$ 最大 306.5×10^5 ）であった。

平成9年6月より近畿臍帯血バンクにおいても患者登録を開始した。患者登録の手続きは近畿臍帯血バンク事務局に臍帯血検査依頼書で申し込み，評価委員会の審査を得たのちHLA typeの検索を行っている。登録患者36例と臍帯血272標本のHLA type

との一致率は完全一致3症例（8.3%），1 locus mismatchまで範囲を広げると10症例（27.8%）あり，少ない臍帯血標本でも一致率は高くなっている。近畿臍帯血バンクでは1例目（完全一致）が平成9年9月に行われ，平成10年2月に2例目（1 locus mismatch），更に3月にもう1例予定されている。

考察

現在，臍帯血標本のHLA-A,B,C locus検査は血清学的，DRの結果はDNA allele typeで登録しているが検索はDR locusで行っている。HLA検査時の問題としてA,B,C locusは各施設毎に独自のトレーで細胞毒試験により検査が行われており若干検査データに差が出ているので，今後は統一トレーによる検査システムが必要である。また採取されてから検査までに時間のかかる場合も多く，判定に困難な臍帯血標本もみられる。

臍帯血バンクは，まだ始まったばかりであり経済的な問題，保険適応など多くの問題を抱えている。今後，早急に骨髄移植と同じく保険適応による検査，採取，凍結保存費用の負担軽減が必要である。

現在，各施設の倫理委員会で承認され，近畿臍帯血バンクで認められている移植可能な施設は，大阪府立母子総合医療センター小児科，大阪府立総合医療センター小児科の2施設で，今後保険適応となれば多くの施設で移植が行われる可能性がある。

日本組織適合性学会よりのお知らせ

平成10年7月17日に開催された第7回日本組織適合性学会総会において、下記のような会則の変更が承認されましたのでお知らせします。なお、改訂后会則の全文は本誌に掲載しますが、日本組織適合性学会ホームページ (<http://square.umin.ac.jp/JSHI/mhc.html>) にも掲載されています。

記

第3章 第11条 (役員)

役員に「指名理事 若干名」を加える。

評議員会の議を経て、大会長が任命するものとする。」に変更する。

第3章 第12条 (選任)

2. の「理事及び監事は、評議員会において、評議員の中から互選により選出する」を

「理事及び監事は、評議員の中から互選により選出する」に変更する。

「4. 必要に応じて若干名の指名理事をおくことが出来る。指名理事は、評議員の中から会長が推薦し、理事会、評議員会の議を経るものとする。」を加える。

第4章 第21条 (理事会)

「毎年2回会長がこれを召集する」を

「毎年1回会長がこれを召集する」に変更する。

第4章 第23条 (委員会)

「委員会の設置及び委員の選任は、」を

「委員会の設置は、」に変更する。

「会長が行う。」を

「会長が行う。なお、各委員会の委員長及び委員の選任に関する細則は別に定める。」に変更する。

第3章 第13条 (職務)

「2. 理事は」を

「2. 理事及び指名理事は」に変更する。

第6章 第27条 (編集)

「会報の編集は、評議員の中から互選によって選出された編集委員が別に定める会報規定に基づいて行う。」を

「会報の編集は、編集担当理事が編集委員会を組織し、別に定める会報規定に基づいて行う。」に変更する。

第3章 第14条 (任期)

「任期は2年とする。」を

「任期は2年とする。但し、任期の開始は選出後の最初の理事会とし、次期役員候補選出後の最初の理事会まで継続するものとする。また、指名理事の任期は会長の任期の期間中とする。」に変更する。

第7章 第29条 (会費)

「本会の年会費は、次に定めるとおりとする。

1、正会員：年額5,000円

2、特別会員：免除

3、名誉会員：免除

4、賛助会員：年額100,000円」を削除し、以下の表記に変える。

第4章 第16条 (学術集会)

「委託する。」を

「委託する。また、大会長は、学術集会を主催する上でその補佐を行う大会幹事1名をおくことが出来る。大会幹事は、大会長が推薦し、理事会、

「会員は本会の経費にあてるため、年会費を納入しなければならない。但し、特別会員及び名誉会員はこの限りではない。」に変更する。

また、これに対応して以下の年会費の規定を別途設ける。

年会費規定：

1. 年会費は、次に定めるとおりとする。
 - 1、正会員：年額5,000円
 - 2、特別会員：免除
 - 3、名誉会員：免除
 - 4、賛助会員：年額100,000円
2. 年会費の変更は、会計担当理事の提案によって、理事会、評議員会の議を経て総会で決定する。

細則の追加。

3. (委員会委員長及び委員の選任について)

平成10年7月17日追加

本会の運営上必要な委員会の委員長は理事の互選とする。委員は、会員の中から当該委員長が選任し、理事会の議を経て、評議員会の承認を受けるものとする。

以上

日本組織適合性学会会則

(平成10年7月17日改訂)

第1章 総則

(名称)

第1条 本会は、日本組織適合性学会 (Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics、略称 JSHI) と称す。

(事務局)

第2条 本会の事務局は、日本赤十字社中央血液センターにおく。

(目的)

第3条 本会は、組織適合性とそれに関する学問の進歩発展に資するため、国内のみならず国外の関連機関とも連絡を密にして研究の促進を図り、その成果の応用を通じて広く人類の健康と福祉に貢献することを目的とする。

(事業)

第4条 本会は、前条の目的を達成するため次の事業を行う。

1. 学術集会 (学術集会、講演会、ワークショップなど) の開催
2. 研究資料の刊行
3. 内外関連研究機関および研究組織との連絡

4. HLA タイピングの精度向上に関する事業
5. その他本会の目的を達成するに必要な事業

第2章 会員

(会員の資格)

第5条 本会の会員は次のとおりとする。

1. 正会員：本会の目的に賛同した者で、第6条に定める入会手続きを経て入会し、年会費を納入した者
2. 特別会員：本会对し特別の功労があり、理事会、評議員会の議を経て会長が推薦し、総会において承認された者
3. 名誉会員：本会の正会員として本会の発展に著しい功労のあった者で、理事会、評議員会の議を経て、総会において承認された者
4. 賛助会員：本会の目的に賛同し、本会の事業を援助するために第6条に定める入会手続きを経て入会し、年会費を納入した団体または個人

(入 会)

第6条 本会に入会を希望するものは、所定の入会申し込み書に年会費を添えて申し込むものとする。

(年会費)

第7条 年会費は別途これを定める。既納の会費は返却しない。

(会員の権利)

第8条 会員は本会の事業に関する連絡を受け、学術集会や本会の行う事業に参加することができる。

(退 会)

第9条 本人より退会の申し出のあった会員、および年会費を3年以上未納の会員は退会とみなし、学術集会を含む本会の事業の連絡を停止する。

(除 名)

第10条 本会の目的に反する行為のあった会員は、理事会および評議員会の議決により、総会の承認を得て除名することができる。

第3章 役員

(役 員)

第11条 本会に次の役員を置く。

会 長	1名
理 事	若干名
監 事	2名
評 議 員	若干名
指名理事	若干名

(選 任)

第12条 役員は次の規定によって選任する。

1. 評議員は、正会員の中から、細則に定める資格を満たすものを理事会および評議員会の議を経て会長が委嘱し、総会の承認を得るものとする。
2. 理事および監事は、評議員の中から互選により選出する。理事と監事は兼務することはできない。
3. 会長は理事会において、理事の中から互選により選出する。

4. 必要に応じて若干名の指名理事をおくことが出来る。指名理事は、評議員の中から会長が推薦し、理事会、評議員会の議を経るものとする。

(職 務)

第13条 本会の役員の職務は次のとおりとする。

1. 会長は、本会を代表し、本会の業務を総轄する。
2. 理事及び指名理事は理事会を構成し、この会則に定められた事項を議決する。各理事は、庶務、会計、編集、渉外などの業務を分掌する。
3. 監事は本会の業務および経理を監査する。
4. 評議員は評議員会を構成し、この会則に定められた事項を議決する。

(任 期)

第14条 会長、理事、監事の任期は2年とする。但し、任期の開始は選出後の最初の理事会とし、次期役員候補選出後の最初の理事会まで継続するものとする。また、指名理事の任期は会長の任期の期間中とする。但し何れの役員も再選は妨げない。

(職 員)

第15条 本会の事務を円滑に処理するため、事務局に事務局長をおく。事務局長は、理事会において理事の中から互選により選出し、その任期は2年とする。事務局は、必要に応じ事務局職員をおくことができる。職員の任免は会長が行う。

第4章 会議

(学術集会)

第16条 学術集会は、原則として年1回行い、大会長がこれを主宰する。大会長は、理事会および評議員会の議を経て会長が委嘱する。また、大会長は、学術集会を主催する上でその補佐を行う大会幹事1名をおくことが出来る。大会幹事は、大会長が推薦し、理事会、評議員会の議を経て、大会長が任命するものとする。学術集会の費用は必要に応じ参加者の負担に

において開催する。

(総会)

第17条 総会は、年1回学術集会に際して開催し、大会長を議長として以下に述べる事項もならびに理事会および評議員会において議決された事項を会員に報告し、承認を受けるものとする。

1. 事業報告ならびに事業計画
2. 会計報告ならびに予算
3. その他

(評議員会)

第18条 評議員会は、年1回の学術集会に際して定期的に開催する外、会長が必要と認めた際は、臨時に評議員会を召集して会務の円滑な運営に当たる。評議員会の議長は、定期の評議員会では該当学術集会の大会長が行い、臨時の評議員会では評議員の互選により選出する。

(評議員の議決)

第19条 評議員会は、別に定める会則改定の場合を除き、評議員の半数以上の出席のもとに、出席者の過半数の賛成がなければ議決することが出来ない。やむをえない事由で評議員が出席できない場合は、議長あるいは他の評議員に委任状を提出し審議を委任することができる。委任状提出者は議決に関し出席者として取り扱われ、その議決権は委任された者が代わりに執行する。

(評議員会議事録)

第20条 評議員会の議事録については次の事項を記載した議事録を作成しなければならない。議事録は議長の責任において作成し、次回の評議員会で内容の確認を得るものとする。

1. 会議の日時および場所
2. 出席者の氏名
3. 議決事項
4. 議事の経過

(理事会)

第21条 理事会は会長が主催する。理事会は、定期理事会および臨時理事会とする。定期理事会は毎年1回会長がこれを召集する。会長は、会長が必要と認めたとき、または3分の1以

上の理事から開催が請求されたときは速やかに臨時理事会を召集しなければならない。

(理事会の議決)

第22条 理事会の3分の2以上の理事が出席し、出席した理事の過半数の賛成がなければ議決することができない。監事は理事会に出席して意見を述べることができるが議決には加わらない。

(委員会)

第23条 本会の業務を遂行するのに必要な委員会を設置することができる。委員会の設置は、理事会および評議員会の議を経て会長が行う。なお、各委員会の委員長及び委員の選任に関する細則は別に定める。

第5章 分科会および地方会

(分科会)

第24条 本会に分科会をおくことができる。分科会の設置ならびに廃止は、理事会および評議員会の議を経て会長が決定する。

(地方会)

第25条 本会の下部組織として地方会をおくことができる。地方会の設置ならびに廃止は、理事会および評議員会の議を経て会長が決定する。

第6章 会報

(会報)

第26条 本会は会報を発行する。この内1回は各年の学術集会の予稿集を兼ねる。

(編集)

第27条 会報の編集は、編集担当理事が編集委員会を組織し、別に定める会報規定に基づいて行う。但し学術集会の予稿集を兼ねる場合には、各大会長に委嘱することができる。

第7章 会計

(経費)

第28条 本会の経費は、会費、補助金、寄付金、その他で支弁する。

(会費)

第29条 会員は本会の経費にあてるため、年会費を納入しなければならない。但し、特別会員及び名誉会員はこの限りではない。

(会計年度)

第30条 本会の会計年度は4月1日より、翌年3月31日とする。

(会計監査)

第31条 収支決算は監事の監査を受けた後、理事会、評議員会ならびに総会の承認を受けるものとする。

第8章 会則の変更および細則

(会則の変更)

第32条 この会則は、理事会、および評議員会の3分の2以上が出席した評議員会の議決を経て、総会の承認を得なければ変更することができない。

(会則の実施)

第33条 この会則の実施に際し疑義を生じた場合、または会則以外に必要な事項が生じた場合は、理事会および評議員会がこれを処理する。

(細則)

第34条 この会則施行についての細則は、理事会、評議員会の議決および総会の承認を経て別に定める。

(付則)

この会則は、平成3年4月8日から施行する。

日本組織適合性学会細則

1. (評議員候補の資格)

新評議員は会員歴（旧日本組織適合性研究会の会員歴を通算）5年以上、組織適合性、HLA等に関する研究発表または論文2編以上を有し、2名の評議員の推薦のあるものとする。

2. (選挙結果同数得票の場合について)

理事、監事の選挙結果、同数得票の場合は、旧理事により、理事、監事を決定する。

変更：平成7年7月14日

3. (委員会委員長及び委員の選任について)

本会の運営上必要な委員会の委員長は理事の互選とする。委員は、会員の中から当該委員長が選任し、理事会の議を経て、評議員会の承認を受けるものとする。

変更：平成10年7月17日

日本組織適合性学会年会費規定

(平成10年7月17日新設)

1. 年会費は、次に定めるとおりとする。

- 1、正会員：年額 5,000円
- 2、特別会員：免除
- 3、名誉会員：免除
- 4、賛助会員：年額 100,000円

2. 年会費の変更は、会計担当理事の提案によって、理事会、評議員会の議を経て総会で決定する。

＜日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定＞

1. 投稿規定

1.1. 原稿様式

提出原稿がそのまま電算写植で印刷できるように、原稿は全て、コンピューターのフロッピーディスクとA4サイズとプリントアウトしたものの両者を提出する。一般的なワープロソフトを使用し、ソフト名を明記する。字体、サイズ、行の字数、行間、などの体裁は自由とする。また、図表については、写植でそのまま掲載できるものを提出するが、挿入箇所を本文に指定する。図については天地を明示する。印刷の際に、縮小または拡大する場合があるので、考慮すること。また、図表の題や説明はワープロで、本文とは別頁に添付する。

1.2. 原著論文

会員からの投稿を原則とするが、編集委員会が依頼することもありうる。日本語、英語を問わない。最初の一頁はタイトルページとし、タイトル、著者名、所属、脚注として代表者とその連絡先（電話、FAX, E-mail, 郵便番号, 住所）を記す。タイトル、著者名、所属は次の様式にしたがう。

Serological and nucleotide sequencing analysis of a novel DR52-associated DRB1 allele with the DR*1307 specificity designated DRB1*1307.

Toshihiko Kaneshige¹⁾, Mitsuo Hashimoto²⁾,

Yayoi Murayama¹⁾, Tomoko Kinoshita²⁾,

Tsutomu Hirasawa¹⁾, Kiyohisa Uchida¹⁾,

Hidetoshi Inoko³⁾

- 1) Shionogi Biochemical Laboratories, Shionogi Company, Osaka, Japan
- 2) Kidney Transplantation Center, Hyogo Prefectural Nishinomiya Hospital, Hyogo, Japan
- 3) Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

HLA class II の DNA typing と MLC

能勢 義介¹⁾, 稲葉 洋行¹⁾, 荒木 延夫¹⁾, 浜中 泰光¹⁾, 阪田 宣彦¹⁾, 土田 文子²⁾, 辻 公美²⁾, 成瀬 妙子³⁾, 猪子 英俊³⁾

- 1) 兵庫県赤十字血液センター, 検査課
- 2) 東海大学医学部, 移植免疫学
- 3) 東海大学医学部, 分子生命科学

内容は、二頁目よりはじめ、要約 (Summary)、はじめに (Introduction)、材料と方法 (Materials and Methods)、結果 (Results)、考察 (Discussion)、参考文献 (References) の順に記載する。また、要約の末尾に日本語で5語以内のキーワードを加える(英文の場合には英語の Key words を加える)。脚注は適宜、設けてもよい。日本語で投稿の場合には、末尾に英語のタイトル、著者名、所属(様式は上述に従う)、英語の要約と英語で5語以内の Key words をつける。枚数に特に指定はないが、速報的な短報(全体で、2,000～3,000字、出来上がりA4版で2～4枚程度)を中心とする。もちろん、フルペーパー(full paper)も歓迎する。なお、参考文献(References)の記載については、下記1.5を参照すること、オリジナル1部にコピー3部を添えて、編集長宛(下記3参照)に送付する。

1.3. 総説, シリーズその他

編集委員会からの依頼を原則とするが、会員からの投稿も大いに歓迎する。日本語を原則とする。タイトル、著者名、所属は上記1.2.の通りにしたが、要約と要約の末尾に日本語で5語以内のキーワードを添える。その他の体裁は自由とするが、構成がいくつかの章、節などから成る場合には、次の番号に従い、適当な見出しを添える。

1. 2. 3. 4. ……
- 1.1. 1.2. 1.3. 1.4. ……
- 1.1.1. 1.1.2. 1.1.3. ……

脚注は適宜，設けてもよい．なお，参考文献 (References) の記載については，下記1.5.を参照すること．

1.4. 校正

校正は編集委員が行い，特別な場合を除き，執筆者は校正を行わない．

1.5. 参考文献

参考文献は，本文中に数字で，例えば (3)，の様に表示し，末尾にまとめて，次のようなスタイルで記載する．ただし，著者名，または編集者名は，筆頭3名まで記載し，以下は省略する．

1. Kaneshige T, Hashimoto M, Murayama A, *et al.* : Serological and nucleotide sequencing analysis of a novel DR52-associated DRB1 allele with the DR*1307 specificity designated DRB1*1307. *Hum. Immunol.* **41** : 151 - 160, 1994.
2. Inoko H, Ota M : *Handbook for HLA Tissue-Typing Laboratories* (eds. Bidwell J, Hui KM), PCR-RFLP. CRC Press, Boca Raton, 1993 ; p. 1 - 70.
3. 能勢義介, 稲葉洋行, 荒木延夫ら : HLA class II の DNA Typing と MLC, 輸血, **39** : 1031 - 1034, 1993.
4. 猪子英俊, 木村彰方 : 岩波講座分子生物科学11 巻, 生物体のまもりかた (本庶佑編), 自己と他の識別, 岩波書店, 東京, 1991 ; p.129 - 194.

2. 別刷

原著論文については，別刷は有料とする．その費用は部数，頁数による．

3. 原稿送付先

〒 259 - 1193 神奈川県伊勢原市望星台

東海大学医学部 分子生命科学系遺伝情報部門 日本組織適合性学会誌 MHC
編集長 猪子 英俊

TEL : 0463 - 93 - 1121 内線 2312

FAX : 0463 - 94 - 8884

E-mail : hinoko@is.icc.u-tokai.ac.jp

編集後記

第7回大会も無事に終了し、既に来年の大会（京都）に向けてがんばっておられる方も多いと思いますが、第8回大会の情報を満載したホームページができました。佐治先生に相応しいホームページで、大会の概要や宿泊などの情報を掲載しております。また、演題申し込みなどでもできるようにする予定です。是非アクセスしてみてください。URL アドレスは、<http://square.umin.ac.jp/JSHI/mhc.html> です。

今号には、第7回大会のQCワークショップの報告書が掲載されているが、その成績は昨年の大会よりも参加施設が20近く増えているにもかかわらず向上していた。前回の大会では全く異なったアリルの報告が見受けられたが、今回の誤りの多くは4桁レベルの下2桁の違いであった。ここで示された成績は、世界的レベルからみて驚異的な、すばらしいものであることは言うまでもないと思う。しかしながら、相変わらず転記ミスや判読ミスといった人為的ミスが解決されていないようであった。また、表記問題も今回のワークショップで表面化され、これから解決して行かなくてはならない問題として提起された。次回のQCではこのような人為的ミスがなくなり、より精度の高いタイピングが行われることを期待している。

(小林 賢)

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

1998年12月1日発行 5巻2号, 1998

定価 2,000円

発行 日本組織適合性学会(会長 片桐 一)

編集 日本組織適合性学会編集委員会(編集担当理事 猪子 英俊)

平成8年7月24日 学術刊行物認可

日本組織適合性学会事務局(事務担当理事 十字 猛夫)

〒150-0012 東京都渋谷区広尾4-1-31 日赤血液センター内

印刷・(株)栄文舎印刷所

〒229-1101 神奈川県相模原市相原2-12-1