

第5回 HLAクオリティコントロール(QC)ワークショップ報告

1. 全体報告

第5回HLA-QCワークショップ経過報告

前田平生¹⁾、平田蘭子¹⁾、小河原悟²⁾、柏瀬貢一³⁾、木村彰方⁴⁾、斉藤 敏⁵⁾、
徳永勝士⁶⁾、成瀬妙子⁷⁾、橋本光男⁸⁾、丸屋悦子⁹⁾、屋敷伸治¹⁰⁾
(HLA標準化委員会)

¹⁾ 埼玉医科大学総合医療センター輸血・細胞治療部, ²⁾ 福岡大学医学部第4内科, ³⁾ 日赤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究所分子病態, ⁵⁾ 信州大学医学部法医学, ⁶⁾ 東京大学大学院人類遺伝学,
⁷⁾ 東海大学医学部分子生命科学系, ⁸⁾ 兵庫県立西宮病院腎移植センター,
⁹⁾ 京都府赤十字血液センター研究部, ¹⁰⁾ 鹿児島大学医学部ウイルス学

1. ワークショップ集会までの経過

今回で5回目の開催になるHLA-QCワークショップは、平成13年3月にMHC誌上においてワークショップ開催の案内が出された。今回から、ワークショップ参加は有料となり、施設参加（5名まで参加可能）は10,000円、個人参加は2,000円とした。参加申込の締切りは、平成13年4月28日で、65施設からの参加申込があった。5月末日に3種類の血液と3種類のDNAサンプルを参加者に郵送した。うち、2件で試験管の破損があり、再郵送した。平成13年7月20日までに64施設からタイピング結果の報告があった。このことは、全施設においてDNA抽出は問題なく行われたと考えられる。8月中に結果をコンピューター入力し、9月中旬に入力内容の確認のため中間報告を参加施設に送付した。また、各キット別のデータ解析を参加施設に依頼

し、各キット別の生データを解析施設に送付した。表1にこれまでの経過を示す。

2. 参加者・参加施設

今回のワークショップ参加施設の、地域別、施設形態別の参加数を表2に示す。地域別では、北海道

表1 第5回HLA-DNAタイピングQCワークショップ

平成13年3月	ワークショップ参加申込
4月末	申込締切り 65施設参加
5月末	サンプル配布 (3血液, 3DNA)
	初めての全血配布, 2件破損, 抽出に問題なし
平成13年7月20日	結果報告締切り 64施設報告
8月	結果データ入力
9月中旬	参加施設へ中間報告 (入力確認)
	10件程度の転記ミス, 判定ミスの報告あり
	データ解析依頼
平成13年10月31日	第5回HLA-QCワークショップ集会

代表者連絡先 〒350-8550 川越市鴨田辻道1981
日本組織適合性学会標準化委員会委員長
埼玉医科大学総合医療センター輸血・細胞治療部
前田平生

電話：0492-28-3506
ファックス：0492-26-3091
E-mail：himaeda@saitama-med.ac.jp

表2 第5回QCワークショップ参加施設（各地域、各施設形態別）

地方	都県	メ- カー	血液セ ンター	検査セ ンター	大学・ 研究所	大学病 院	病院	総計
1. 北海道	北海道		1					1
1. 北海道計			1					1
2. 東北	岩手					1		1
	宮城						1	1
	秋田				1			1
	青森						1	1
	福島	1				1		2
2. 東北計		1				3	2	6
3. 関東甲信越	群馬						2	2
	埼玉	1		1		3		5
	新潟		1				1	2
	神奈川		1		1			2
	千葉						1	1
	長野					1		1
	東京	4	1	2	2	2	1	12
	栃木					1		1
3. 関東甲信越計		5	3	3	3	7	5	26
4. 東海北陸	愛知		1				1	2
	静岡						1	1
	富山		1			1		2
4. 東海北陸計			2			1	2	5
5. 近畿	京都			1		1		2
	大阪		1	1		2		4
	兵庫		1				1	2
5. 近畿計			2	2		3	1	8
6. 中国	岡山		1				1	2
	広島	1	1				1	3
	山口		1					1
6. 中国計		1	3				2	6
7. 四国	愛媛				1		1	2
	香川						1	1
	高知						1	1
	徳島					1		1
7. 四国計					1	1	3	5
8. 九州沖縄	宮崎						1	1
	熊本		1					1
	大分						1	1
	長崎		1					1
	福岡		1			1	1	3
8. 九州沖縄計			3			1	3	7
総計		7	14	5	4	16	18	64

1施設, 東北6施設, 関東甲信越26施設, 東海北陸5施設, 近畿8施設, 中国6施設, 四国5施設, 九州沖縄7施設であった。また, 施設形態としては, 病院34施設で, うち16施設が大学病院であった。また, 血液センターからは14センターが参加し, 病院・血液センターで参加施設の約70%をしめた。その他は, 試薬メーカー等から7施設, 検査センターから5施設, 大学あるいは研究所関連から4施設の参加があった。参加者としては, 22施設から31名が個人参加をし, また43施設から133名が施設参加をした。

3. 各ローカス毎の参加施設

参加施設に関しては, 平成9年に開催された第1回の37施設から平成12年の第4回には68施設へと順調に増加したが, 今回の第5回では, 参加費が有料になったためか, 参加施設は64施設とわずかに減少した。HLA-DRB1アレルタイピングに関しては, 第1回以来参加施設のほぼ全施設が参加しており, DQB1についても50~70%の施設でタイピングされていた。しかし, DPB1については, 第1回の17施設から大きな変動はなく, 今回では15施設へとわずかに減少していた。この間, DRB1, DQB1

タイピングに関しては, 2桁レベルから4桁レベルへのタイピングとより高精度のタイピングが実施されていた。

一方, クラスIアレルに関しては, 第1回では参加施設は皆無であったが, 第2回には11施設が参加し, ほぼ全ての施設でHLA-A, B, Cアレルタイピングが行われていた。その後, A, B, Cローカスの参加施設は順調に増加し, 今回ではそれぞれ53, 51, 38施設が参加した。(図1)

4. まとめ

当初, クラスIIアレル, とくにDRB1アレルを中心にして始められたHLA-QCワークショップは, この2, 3年でのクラスIアレルタイピングキットの開発と普及により, 今回では約80%の参加施設でHLA-A, Bアレルタイピングが実施された。クラスIアレルは, 互いに相同性が高く, かつエクソン2, 3の両方に多型があるため, アレルタイピングは困難であろうと考えられていたが, それらも克服され, 今後はクラスI抗原に関して本格的にアレルタイピングが実施されるであろう。

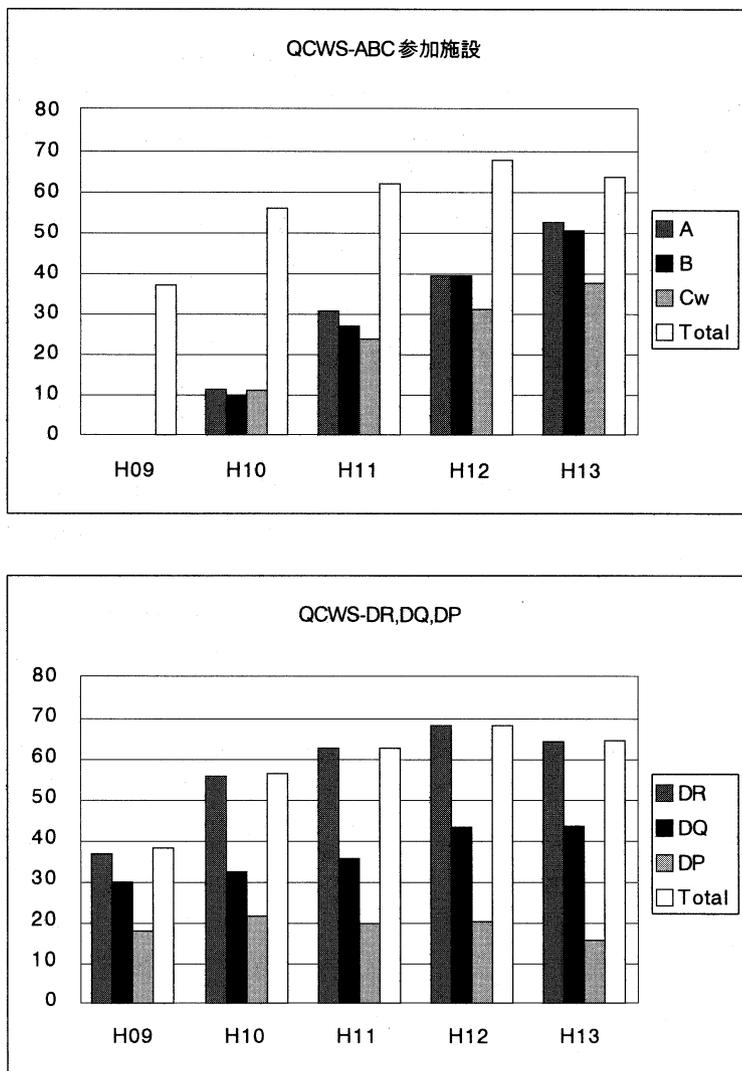


図1 過去5年間(平成9年~13年)のHLA-QCワークショップ参加施設。上段:クラスI, 下段:クラスII

クラス I タイピングの評価

斉藤 敏¹⁾, 橋本光男²⁾, 小河原悟³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 木村彰方⁵⁾, 徳永勝士⁶⁾,
成瀬妙子⁷⁾, 平田蘭子⁸⁾, 丸屋悦子⁹⁾, 屋敷伸治¹⁰⁾, 前田平生⁸⁾
(HLA標準化委員会)

¹⁾ 信州大学医学部法医学, ²⁾ 兵庫県立西宮病院腎移植センター, ³⁾ 福岡大学医学部第4内科, ⁴⁾ 日赤中央血液センター検査三課,
⁵⁾ 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態, ⁶⁾ 東京大学大学院人類遺伝学, ⁷⁾ 東海大学医学部分子生命科学系,
⁸⁾ 埼玉医科大学総合医療センター輸血・細胞治療部, ⁹⁾ 京都府赤十字血液センター研究部, ¹⁰⁾ 鹿児島大学医学部ウイルス学

1. 参加施設

クラス I DNA タイピングの参加施設数は全 QC 参加 53 施設中, A 座 53 施設 (100%), B 座 51 施設 (96%), C 座 38 施設 (72%) で, 全ての QC 参加施設がクラス I のいずれかの座の DNA タイピングを実施し回答した。

2. 方法と試薬

血清学レベルでのタイピング結果の一致は 2 抗原が特定されていることとし, or のついたもの, / のついたもの (A*24 or A11, Cw*06/12/13 等) については不一致とした。ただし, 血清学的回答 (B62, B61 等) も今回の解析では一致とした (3 施設)。アリルタイピングにおいてはコンセンサスと完全一致の場合のみ一致とし, 4 桁表示が 2 桁レベルで間違っている場合は 4 桁解析の対象外とした。明らかに記入ミスと思われた回答については確認後訂正した (2 施設)。

各施設のタイピング方法を表 1 に示す。前回と比較して SBT を使用した施設が増加した。特に B ローカスタイピングにおいては 3 施設が 11 施設になり, それにともない B ローカスタイピングにおいての SSP, SSO 使用施設が大幅に減っていた。C ローカスタイピングにおいては前回同様 SSP 使用比率が群を抜いて高かった。タイピングの煩雑さのためか, RFLP をクラス I タイピングの方法として新たに使用した施設はなく, A, C において前回

より 1 施設減っていた。新しい方法の SPP, RSCA を使用した施設がそれぞれ 3 施設, 2 施設あった。SPP は微量全血から DNA 抽出をせず血清学レベルのタイピングを行う SSP と SSO を組み合わせた方法で, RSCA は理論上全てのアリルの組み合わせをタイピングする事が可能な方法である。また, 全血サンプルが送られてきたことにより, 血清学タイピングを実施した施設もあった。

3. 結果

各施設でのキットの使用数を表 2 に示す。クラス I DNA タイピングにおいてキットを全く使用しなかった施設が 2 施設あったが, それ以外の施設においてはキットを使用していた。それぞれの座に 1 キット, 全座で 3 キット使用した施設がもっとも多く 15 施設あった。そのほか 6 種類のキットを使用した施設が 6 施設, 7 種類使用した施設も 2 施設あった。

使用された方法と不一致の関係及び 4 桁回答率との関係について表 3 - 表 5 に示す。A 座において 53 施設中 28 施設 (52.9%), B 座では 51 施設中 24 施設 (47.0), C 座では 38 施設中 26 施設 (68.4) が 1 法のみでの検査を実施していた。不一致抗原数は A 座 12, B 座 11, C 座 10 の 33 例あり, SSP または SSO のみの 1 方法によるタイピングで 25 例, SSO+SSP の 2 方法によるタイピングで 4 例, SBT で 2 例, SSO+SPP, SSP+SSCP

表1 クラス I DNAタイピングの方法と使用キット

HLA-A 53施設(新規:8)					HLA-B 51施設(新規:7)					HLA-C 38施設(新規:6)				
方法	N	%	キット名	N	方法	N	%	キット名	N	方法	N	%	キット名	N
SSO	33	62.3	Reli	17	SSO	31	60.8	Reli	16	SSO	11	28.9	MPH	6
			MPH	10				MPH	8				Reli	3
			Inolipa	3				Inolipa	4				MRHA	2
			MRHA	3				MRHA	3				Inolipa	1
			Elpha	1				Elpha	1					
SSP	30	56.6	Micro-SSP	18	SSP	28	54.9	Micro-SSP	18	SSP	30	78.9	Micro-SSP	16
			Dynal-SSP	5				Unitray	6				Unitray	5
			Unitray	4				Dynal-SSP	3				Dynal-SSP	4
			SSP-JPN	2				SSP-JPN	1					
SBT	8	15.1	ABI	3	SBT	11	21.6	ABI	3	SBT	6	15.8	AlleleSEQR	1
			Genekit	1				Genekit	1					
			AlleleSEQR	1				AlleleSEQR	1					
SSCP	7	13.2			SSCP	4	7.8			SSCP	3	7.9		
RFLP	3	5.7			RFLP	3	5.9			RFLP	1	2.6		
SPP	3	5.7	Smitest	3	SPP	3	5.9	Smitest	3					
RSCA	2	3.8	RSCA	2	RSCA	2	3.9	RSCA	2	RSCA	1	2.6	RSCA	1

表2 各施設におけるローカス別使用キット数

使用 キット数	HLA			クラス I 全体
	A	B	C	
0	2	3	7	2
1	31	28	23	3
2	18	18	8	12
3	2	2	0	15
4	0	0	0	5
5	0	0	0	8
6	0	0	0	6
7	0	0	0	2
計	53	51	38	53

のタイピング方法でそれぞれ1例ずつ不一致があった。

A座、B座のアリルタイピングにおいて、1方法のみ(SBTをのぞく)を実施した施設での4桁回答率が低く、正確なアリルタイピング結果を報告したほとんどの施設は2法以上を使用していた。

アリルタイピングにおけるA座の不一致は4例であり、SSO、SSP、SSCPの3法を使用した2施設がA*0216をA*0201とし、SSPのみの施設がA*0206/A*0210をA*0210ホモとし、RSCAのみの施設がA*0206/A*0210をA*0207/A*0226としていた。

B座の不一致はSSO+SSPを実施した施設でのB*2704をB*2701とした1例のみであった。

C座の不一致はSSPによる判定でCw*0702をCw*0704、Cw*0403をCw*0401/02とした2例とSBTを使用した施設のCw*1502をCw*1503とした計3例であった。

表6に配布された全サンプルのクラスIのコンセンサスと一致率を示す。

A、B、C全ての座において血清学レベルでの一致率は98%であった。

アリルレベルでの一致率はA座38%、B座50%、C座57%であり、A*2402、B*5101、B*3501の一致率がきわめて低く、一方B*5901、B*4006、Cw*1202、Cw*0303の一致率が高かった。

4. 考察

クラスI DNAタイピングキットの開発が進み、前回からクラスI DNAタイピングに参加する施設

数が増え、今回はQC参加施設全てがA, B, CいずれかのクラスI DNAタイピングを実施し、血清

学レベルでの成績は前回同様良いものであった。しかし、A11をA1, B27をB47, B35をB51と判定し

表3 方法別一致率 HLA-A

方法	施設数 (N)	使用比率 (%)	不一致抗原数	不一致数/回答抗原数 (%)	4桁回答数	4桁回答率*	不一致アリル数
SSO	14	26.4	11	6.5	34	22.1	0
SSP	10	18.9	0	0	7	6.4	1
SBT	2	3.8	0	0	22	100.0	0
SPP	1	1.9	0	0	0	0.0	0
RSCA	1	1.9	0	0	5	45.5	1
SSO+SSP	12	22.6	1	0.7	52	39.4	0
SSP+SBT	2	3.8	0	0	17	77.3	0
SSO+SPP	1	1.9	0	0	0	0.0	0
SSP+SSCP	1	1.9	0	0	1	9.1	0
SSP+RFLP	1	1.9	0	0	11	100.0	0
SBT+RSCA	1	1.9	0	0	11	100.0	0
SSO+SSP+SSCP	2	3.8	0	0	12	54.5	2
SSO+SBT+SSCP	1	1.9	0	0	11	100.0	0
SSO+SSCP+RFLP	1	1.9	0	0	11	100.0	0
SSP+SBT+SPP	1	1.9	0	0	11	100.0	0
SSO+SSP+SBT+SSCP	1	1.9	0	0	11	100.0	0
SSO+SBT+SSCP+RFLP	1	1.9	0	0	11	100.0	0
計	53	100.0	12	1.9	227	38.9	4

*: (4桁回答数/全A座抗原数) x100

表3 方法別一致率 HLA-B

方法	施設数 (N)	使用比率 (%)	不一致抗原数	不一致数/回答抗原数 (%)	4桁回答数	4桁回答率*	不一致アリル数
SSO	12	23.5	1	0.7	53	44.2	0
SSP	9	17.6	5	4.6	15	16.7	0
SBT	2	3.9	2	8.3	15	75.0	0
SPP	1	2.0	0	0	0	0.0	0
SSO+SSP	12	23.5	2	1.4	64	53.3	0
SSP+SBT	2	3.9	0	0	13	65.0	0
SSO+SPP	1	2.0	1	8.3	7	70.0	1
SSO+SBT	1	2.0	0	0	10	100.0	0
SSP+SSCP	1	2.0	0	0	2	20.0	0
SSP+RSCA	1	2.0	0	0	8	80.0	0
SSP+RFLP	1	2.0	0	0	10	100.0	0
SBT+RFLP	1	2.0	0	0	10	100.0	0
SBT+SPP	1	2.0	0	0	6	60.0	0
SBT+RSCA	1	2.0	0	0	10	100.0	0
SSO+SSP+SSCP	2	3.9	0	0	9	45.0	0
SSO+SBT+SSCP	1	2.0	0	0	8	80.0	0
SSO+SBT+RFLP	1	2.0	0	0	9	90.0	0
SSO+SSP+SSCP+SBT	1	2.0	0	0	10	100.0	0
計	51	100.0	11	1.8	259	50.8	1

*: (4桁回答数/全B座抗原数) x100

たケースや、B59とB51あるいはB59とB55の識別不能といったような血清学検査では起こらないと思われる不一致があった。血清学で識別可能な抗原については正確に識別できるような簡便で安価なキットのさらなる改良を願う。また、アリルタイピングにおいて同じキットを使用した他の施設は一致したデータを出していたにもかかわらず、2施設がA*0216をA*0201としたことや、1施設でA*0206/A*0210をA*0210ホモとしたことから、使用するキットの特性とその識別限界も理解しておく必要があると考えられた。

アリルタイピングにおいて一致率の低かったアリルは塩基配列にアリル特異的変異が存在せず、同じジェノタイプ内の他のアリルを全て否定しなければならないアリルで、逆に一致率の高かったアリルは塩基配列にアリル特異的変異が存在するアリルであった。A*02ジェノタイプを例にとるとA*0216は53%、A*0210は51%、

表5 方法別一致率 HLA-C

方法	施設数 (N)	使用比 率(%)	不一致 抗原数	不一致数/回答 抗原数(%)	4桁 回答数	4桁 回答率*	不一致 アレル数
SSP	19	50.0	7	3.1	91	44.0	2
SSO	4	10.5	1	2.1	26	61.9	0
SBT	3	7.9	0	0	31	93.9	1
SSO+SSP	6	15.8	1	1.4	40	60.6	0
SSP+SSCP	2	5.3	1	4.2	14	63.6	0
SSP+SBT	2	5.3	0	0	20	90.9	0
SSP+RSCA	1	2.6	0	0	4	36.4	0
SSO+SBT+SSCP+RFLP	1	2.6	0	0	11	100.0	0
計	38	100.0	10	2.2	237	57.2	3

*: (4桁回答数/全C座抗原数)x100

表6 配布サンプルの一致率

		H1301		H1302		H1303		H1304		H1305		H1306		座別一致率
HLA-A*		1101	2402	0216	0301	0101	0206	2402	0206	2601	0206	0210	HLA-A*	
一致率(%)	Low	96	98	100	96	96	100	98	98	100	100	98	98	
	High	32	28	53	33	45	38	30	36	40	34	51	38	
HLA-B*		1506	2704	5101		3701	0702	3501	3501	5901	1501	4006	HLA-B*	
一致率(%)	Low	100	96	100		98	98	96	98	94	100	98	98	
	High	59	45	28		69	53	28	31	78	41	71	50	
HLA-Cw*		0403	1202	0704	1502	0602	0303	0702	0102	0303	0303	0801	HLA-Cw*	
一致率(%)	Low	97	89	100	100	95	100	100	100	100	100	97	98	
	High	40	76	32	38	66	76	42	55	71	76	50	57	

A*0206がそれぞれ36%、38%の一致率であり、今回なかったA*0201が配布されていたら一致率はA*2402、B*5101、B*3501同様30%以下になることが推測された。今後、新たなアレルの増加に伴いこのようなアレルをタイプするために、ジェノタイプ内の他のアレル全てを否定することは現実的でなくシーケンスをとる以外厳密には識別不可能と思われた。

不一致の原因としては検査方法による場合と人的な場合が考えられ、検査方法に問題がある場合には方法の改良や別の方法を使う必要があり、要求されている結果のレベルにあわせた方法を選択する必要がある。また、使用する方法の長所短所を理解し短所を補えあえる2法以上を組み合わせ検査すること

が望ましい。

人的な不一致には操作ミス、判定ミス、転記ミス、知識不足が考えられるが、担当者が一人の場合には操作ミス以外は修正が難しいと思われる。操作ミスの中で一番大きな原因であるコンタミについては現在の環境を改善し、DNA検査の基本であるフィルター付きのチップの使用やPCR

R産物を扱う場所を区別する、仕事の最後に次亜塩素酸ソーダで消毒する等の処置をとる必要がある。

今回QCワークショップのデータをまとめるに当たり、参加施設それぞれがどのような目的を持ってQCに参加しているのか？1検体にかかるタイピングの費用は？同一キットを使用しての精度管理の必要性は？今回の配布DNA中にホモタイプのサンプル

があったことから確認のために高価なキットを何種類も使用したり、様々な方法による確認を行ったと思われる施設があったが、通常の検体のタイピングにおいても同様な確認検査を実施しているのか等々について疑問を持ったことを最後に付記しておきたい。

クラスIIタイピングの評価

橋本光男¹⁾, 齊藤 敏²⁾, 小河原悟³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 木村彰方⁵⁾, 徳永勝士⁶⁾,
成瀬妙子⁷⁾, 平田蘭子⁸⁾, 丸屋悦子⁹⁾, 屋敷伸治¹⁰⁾, 前田平生⁸⁾
(HLA標準化委員会)

¹⁾ 兵庫県立西宮病院腎移植センター, ²⁾ 信州大学医学部法医学, ³⁾ 福岡大学医学部第4内科, ⁴⁾ 日赤中央血液センター検査三課,

⁵⁾ 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態, ⁶⁾ 東京大学大学院人類遺伝学, ⁷⁾ 東海大学医学部分子生命科学系,

⁸⁾ 埼玉医科大学総合医療センター輸血・細胞治療部, ⁹⁾ 京都府赤十字血液センター研究部, ¹⁰⁾ 鹿児島大学医学部ウイルス学

1. 参加施設

今回のQCワークショップに参加した64施設のうち54施設が継続参加で、残りの10施設が新規参加であった。各遺伝子座毎の参加内訳は、DRB1アレルが64施設、DR B3/4/5アレルが38~39施設、DQA1, DQB1, DPB1アレルはそれぞれ、13, 43, 15施設で、前年とほぼ同数の参加であった(表1)。

2. タイピング方法と異なる方法の併用

前回まではタイピング方法及び対象遺伝子座は参加施設によりかなり異なっていたが今回からは遺伝子座により特定の方法を取り入れているのが特徴である。即ち、DR遺伝子座のタイピングにはPCR-SSOP法(37.4%)が用いられ、DQ, DP遺伝子座のタイピングには各々、PCR-SSP法(51.7%), PCR-RFLP法(61.9%)が採用されている(表2)。

異なる方法の併用については、特にDR遺伝子座のタイピングにおいて参加64施設の約60%に当たる37施設が2種類以上の異なる方法を用いている。一方、DQ及びDP遺伝子座については、DR遺伝子座とは逆に約60%以上の施設が1種類の方法でタイピングを実施している(表3)。方法の組み合わせは、DR遺伝子座のタイピングには、PCR-SSO法とPCR-SSP法の組み合わせが全体の37.5%を占めているのに対し、DQ遺伝子座はPCR-SSP法とPCR-RFLP法或いはPCR-SSP法とPCR-SSO法を組み合わせるタイピングを行っている施設が共に41.1%を

占めている。一方、1種類の方法でタイピングを実施している施設はDR及びDQ遺伝子座共にPCR-SSP法を用いている施設が多い(表4)。

表1 QCワークショップ参加施設数

	第1回(1997)	第2回(1998)	第3回(1999)	第4回(2000)	第5回(2001)
	施設数(%)	施設数(%)	施設数(%)	施設数(%)	施設数(%)
DRB1					
Low	4 (11.1)	8 (14.8)	13 (21.3)	19 (28.4)	15 (23.4)
Middle	0 (0)	2 (3.7)	2 (3.3)	6 (9.0)	12 (18.8)
High	32 (88.9)	44 (81.5)	46 (75.4)	42 (62.7)	37 (57.8)
計	36	54	61	67	64
DRB3					
Low	3 (18.8)	4 (13.3)	16 (44.4)	12 (30.0)	16 (41.0)
Middle	1 (6.3)	0 (0)	4 (11.1)	4 (10.0)	9 (23.1)
High	12 (75.0)	26 (86.7)	16 (44.4)	24 (60.0)	14 (35.9)
計	16	30	36	40	39
DRB4					
Low	10 (62.5)	19 (67.9)	22 (71.0)	28 (71.8)	24 (61.5)
Middle	0 (0)	4 (14.3)	5 (16.1)	2 (5.1)	7 (17.9)
High	6 (37.5)	5 (17.9)	4 (12.9)	9 (23.1)	8 (20.5)
計	16	28	31	39	39
DRB5					
Low	0 (0)	3 (13.0)	7 (21.2)	13 (34.2)	19 (50.0)
Middle	0 (0)	1 (4.3)	2 (6.1)	3 (7.9)	7 (17.9)
High	14 (100)	19 (82.6)	24 (72.7)	22 (57.9)	12 (31.6)
計	14	23	33	38	38
DQA1					
Low	3 (27.3)	3 (33.3)	4 (36.4)	3 (21.4)	1 (7.7)
Middle	0 (0)	0 (0)	2 (18.2)	2 (14.3)	4 (30.8)
High	8 (72.7)	6 (66.7)	5 (45.5)	9 (64.3)	8 (61.5)
計	11	9	11	14	13
DQB1					
Low	0 (0)	3 (9.4)	8 (22.2)	14 (32.6)	8 (18.6)
Middle	0 (0)	0 (0)	2 (5.6)	4 (9.3)	11 (25.6)
High	29 (100)	29 (90.6)	26 (72.2)	25 (58.1)	24 (55.8)
計	29	32	36	43	43
DPB1					
Low	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Middle	1 (5.9)	0 (0)	2 (11.1)	0 (0)	1 (6.7)
High	16 (94.1)	21 (100)	16 (88.9)	20 (100)	14 (93.3)
計	17	21	18	20	15

3. 第5回QC-WS配付DNAサンプルのHLAクラスIIコンセンサスタイプ

今回配付した6種類のDNAサンプルのコンセンサスHLAクラスII遺伝子型を表5に示す。これらのコンセンサスタイプは各施設からの報告を基に推定し

たものである。6種類のDNAサンプルのうちH1302とH1303を除いた4種類のサンプルは日本人集団に一般的なクラスIIハプロタイプを形成しており、詳細については前回の第4回クオリティコントロール(QC)ワークショップ報告「日本人のHLAアレルとその対応抗原2000」を参考にして頂きたい。

表2 クラスIIタイピング方法

locus	SSOP (%)	SSP (%)	RFLP (%)	SBT (%)	SSCP (%)	PHFA (%)
DR	37 (37.4)	28 (28.3)	16 (16.2)	9 (9.1)	9 (9.1)	0 (0)
DQ	11 (19.0)	30 (51.7)	15 (25.9)	1 (1.7)	1 (1.7)	0 (0)
DP	1 (4.8)	2 (9.5)	13 (61.9)	3 (14.3)	1 (4.8)	1 (4.8)

表3 異なる方法の併用

遺伝子座	4種類 (%)	3種類 (%)	2種類 (%)	1種類 (%)	計
DR	1 (1.6)	10 (15.6)	26 (40.6)	27 (42.2)	64
DQ	0 (0)	2 (5.1)	15 (38.5)	22 (56.4)	39
DP	0 (0)	1 (6.7)	4 (26.7)	10 (66.7)	15

表4 方法の種類と組み合わせ

DR				DQ				DP			
方法(1)	方法(2)	採用数 (%)	High (%)	方法(1)	方法(2)	採用数 (%)	High (%)	方法(1)	方法(2)	採用数 (%)	High (%)
SSO	SSP	21(37.5)	8 (38.1)	SSP	RFLP	7 (41.1)	7 (100)	RFLP	SSP	2 (28.6)	2 (100)
SSO	RFLP	9 (16.1)	8 (88.9)	SSP	SSO	7 (41.1)	4 (57.1)	RFLP	SBT	2 (28.6)	1 (100)
SSO	SSCP	8 (14.3)	7 (87.5)	RFLP	SSO	2 (11.8)	2 (100)	RFLP	PHFA	1 (14.3)	1 (100)
SSP	SSCP	8 (14.3)	7 (87.5)	RFLP	SSCP	1 (5.9)	1 (100)	RFLP	SSCP	1 (14.3)	1 (100)
RFLP	SSCP	4 (7.1)	3 (75.0)	計		17		SSCP	SBT	1 (14.3)	1 (100)
RFLP	SBT	3 (5.4)	3 (100)	SSP		16(72.7)	4 (25.0)	計		7	
SSO	SBT	2 (3.6)	2 (100)	RFLP		4 (18.2)	4 (100)	RFLP		8 (80.0)	7 (87.5)
SSP	SSCP	1 (1.8)	1 (100)	SBT		1 (4.5)	0 (0)	SSO		1 (10.0)	1 (100)
計		56		SSO		1 (4.5)	0 (0)	SBT		1 (10.0)	1 (100)
SSP		13(48.1)	1 (7.7)	計		22		計		10	
SSO		7 (25.9)	0 (0)								
RFLP		4 (14.8)	3 (75.0)								
SBT		3 (11.1)	0 (0)								
計		27									

表5 平成13年度QCWSパネルのHLAクラスII遺伝子型 (コンセンサスタイプ)

DNA ID	DRB1(1)	DRB1(2)	DRB3/4/5(1)	DRB3/4/5(2)	DQA1(1)	DQA1(2)	DQB1(1)	DQB1(2)	DPB1(1)	DPB1(2)
H1301	*1602	-	5*0202	-	*0102	-	*0502	-	*0101	*0301
H1302	*1104	*1201	3*0202	-	*0505	-	*0301	-	*0201	*0402
H1303	*1601	-	5*0202	-	*0102	-	*0502	-	*0401	*1401
H1304	*0101	*1501	5*0101	-	*0101	*0102	*0501	*0602	*0201	*0402
H1305	*0405	*1101	3*0202	4*0103	*0303	*0505	*0302	*0401	*0501	-
H1306	*0406	*1201	3*0101	4*0103	*0301	*0505	*0302	-	*0201	-

99.2%で、DRB1*11, DRB1*15/16と報告していた。High resolutionレベルではこれら7種類の遺伝子型のうちDRB1*0405, *0406, *1101の3種類につ

いてそれぞれ、DRB1*0406, *0405, *1104のミスタイプを報告していたが(一致率: 97.6%, 97.7%, 97.1%), 他の4種類については100%の一

表6 DRB 1 遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total
	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	一致率
DRB1*0101	64	64	100	13	13	100	36	36	100	100
DRB1*1501	64	64	100	14	14	100	35	35	100	100
DRB1*1601	128	119	93.0	22	19	86.4	72	62	86.1	88.5
DRB1*1602	128	127	99.2	8	7	87.5	96	96	100	95.6
DRB1*0405	64	64	100	8	8	100	41	40	97.6	99.2
DRB1*0406	64	64	100	7	7	100	43	42	97.7	99.2
DRB1*1101	64	64	100	14	14	100	34	33	97.1	99.0
DRB1*1104	64	63	98.4	12	11	91.7	35	29	82.9	91.0
DRB1*1201	64	63	98.4	19	19	100	31	31	100	99.5
計	704	692	98.8	117	112	96.2	423	404	95.7	96.9

表7 DRB 3 / 4 / 5 遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total
	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	一致率
DRB3*0101	78	69	88.5	20	20	100	26	26	100	96.2
DRB3*0202	156	134	85.9	32	26	81.3	56	56	100	89.0
DRB4*0103	77	65	84.4	13	13	100	17	17	100	94.8
DRB5*0101	38	31	81.6	7	6	85.7	16	16	100	89.1
DRB5*0202	150	129	86.0	28	26	92.9	40	39	97.5	92.1
計	499	428	85.3	100	91	92.0	155	154	99.5	92.2

表8 DQB 1 遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total
	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	一致率
DQB1*0301	84	84	100	32	32	100	44	44	100	100
DQB1*0302	127	127	100	41	39	95.1	69	69	100	98.4
DQB1*0401	43	43	100	10	10	100	26	25	96.2	98.7
DQB1*0501	43	43	100	7	7	100	26	26	100	100
DQB1*0502	170	170	100	28	26	92.9	104	104	100	97.6
DQB1*0602	43	42	97.7	10	10	100	22	22	100	99.2
計	510	509	99.6	128	124	98.0	291	290	99.4	99.0

表9 DQA 1 遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total
	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	一致率
DQA1*0101	13	13	100	5	5	100	7	7	100	100
DQA1*0102	65	65	100	10	10	100	50	50	100	100
DQA1*0301	13	13	100	3	3	100	7	7	100	100
DQA1*0303	13	13	100	3	3	100	7	7	100	100
DQA1*0505	52	52	100	28	20	71.4	20	20	100	90.5
計	156	156	100	49	41	94.3	91	91	100	98.1

致率が得られている。特に、DRB1*1602については、第2回QC-WSでH1001サンプルでも検討され、Low及びHigh resolutionレベルで、それぞれ96.4%、95.6%の一致率であったのが、今回は99.2%、100%と一致率が向上している。一方、今回の配付サンプルで一致率が低かったのは、サンプルH1302とH1303のDRB1*1104とDRB1*1601の2種類の遺伝子型である。これらの遺伝子型は今回のQC-WSで始めて配付するサンプルで、しかも日本人集団には稀少なアリルなので、Low resolutionにおいても一致率がそれぞれ、98.4%、93.0%の結果であった。ミスタイプの原因は、DRB1*1104をDR11/14/1307、DRB1*1601をDR15/16と報告し

ていることから、使用する市販キットにより、これらの遺伝子型の血清学的な特異性をLow resolutionレベルではアサインできないと考えられる。DRB1*1104と*1601遺伝子型のMiddle及びHigh resolutionレベルではさらに一致率が低く、Middleでは、それぞれ91.7%、86.4%、そしてHighでは82.9%、86.1%の一致率であった。ミスアサインは全てDRB1*1101、DRB1*1602と報告されていた。全体としては96.9%の一致率で前回の99.0%を下回る結果であったが、これらのDNAサンプルは非常に貴重であるので、各施設での再検討を切望する。

表10 DPB 1 遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total
	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	一致率
DPB1*0101	15	15	100	1	1	100	14	14	100	100
DPB1*0201	60	59	98.3	4	4	100	56	55	98.2	98.8
DPB1*0301	15	15	100	1	1	100	14	14	100	100
DPB1*0401	15	15	100	1	1	100	14	14	100	100
DPB1*0402	30	30	100	2	2	100	28	28	100	100
DPB1*0501	30	30	100	2	2	100	28	28	100	100
DPB1*1401	15	15	100	1	1	100	14	14	100	100
計	165	164	99.7	11	11	100	154	153	99.7	99.8

表11 異なる方法の併用と一致率

DRB1			Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total
併用数	施設数	(%)	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	一致率
3種類	11	17.2	132	132	100	6	6	100	126	125	99.2	99.7
2種類	26	40.6	312	307	98.4	51	49	96.1	211	202	95.7	96.7
1種類	27	42.2	324	322	99.4	77	77	100	119	112	95.7	98.4

DQB1			Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total
併用数	施設数	(%)	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	一致率
3種類	2	5.1	24	24	100	0			24	24	100	100
2種類	15	38.5	180	178	98.9	23	23	100	157	155	98.7	99.2
1種類	22	56.4	264	262	99.2	164	164	100	100	100	100	99.7

DPB1			Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total
併用数	施設数	(%)	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	報告件数	一致数	一致率	一致率
3種類	1	6.7	12	12	100	0			12	12	100	100
2種類	4	26.7	48	47	97.9	0			48	47	97.9	97.9
1種類	10	66.7	120	120	100	13	13	100	107	107	100	100

5. DRB3/4/5遺伝子型の一致率

今回配付されたサンプルのDRB3/4/5遺伝子型は、DRB3*0101, *0202, DRB4*0103, DRB5*0101, *0202の計5種類である(表7)。今回は特に、155例のHigh resolutionレベルでのタイピング結果報告のうち、DRB5*0202のホモと考えられるサンプルH1303をDRB5*0201, *0202のヘテロと報告した1例を除いた154例において一致が認められた(一致率:99.5%)。一方、Low resolutionレベルでの結果が85.3%の一致率しか得られなかったのは、前回までは例えばDRB3*01というタイプをDRB3*01/02/03といった報告も一致と集計してきたが、今回はDRB3*01を決定できないものとみなして不一致と条件を厳しく設定した影響が考えられる。全体としては92.2%の一致率で、他のクラスII 遺伝子座のタイピングと比較して最も低い一致率であった。

6. DQA1, DQB1遺伝子型の一致率

今回のDQB1遺伝子型は、DQB1*0301, *0302, *0401, *0501, *0502, *0602の6種類である。Low, Middle及び High resolution共に99.6%, 98.0% そして99.4%と高率で、全体としても

99.0%とほぼ問題なくタイピングが可能と考えられた(表8)。同様にDQA1遺伝子型タイピングも5種類のDQA1アレルのうちMiddle resolutionレベルでのDQA1*0505を除き(一致率:71.4%), 他は100%の一致率であった(表9)。

DQA1*0505については、第3回QC-WSで3種類のサンプル(H1103, H1104, H1106)を送付したが、その時のHigh resolutionレベルでの一致率が19%であった。今回も3種類のサンプル(H1302, H1305, H1306)にDQA1*0505が含まれているが、High resolutionタイピングでは100%の一致率で確実にアサインが可能となったと考えられる。日本人集団では、DRB1*1101-DRB3*0202-DQA1*0505-DQB1*0301とDRB1*12-DRB3*0101-DQA1*0505-DQB1*0301のハプロタイプが一般的であるが、今回送付したH1305*とH1306のDRB1*1101, DRB1*1201は共にDQA1*0505-DQB1*0302のDQ8の特異性と連鎖していると推定される。

7. DPB1遺伝子型の一致率

今回送付したDPB1遺伝子型は、日本人集団によく認められるDPB1*0201, *0401, *0402, *0501の4種類と、3種類の低頻度アレルであるDPB1*0101, *0301, *1401の計7種類である(表10)。今回のDPB1遺伝子型タイピングに参加している15施設のうち1施設のみが、サンプルH1306のDPB1*0201のホモをDPB1*0201, *090と報告していたが、全体としては99.8%の一致率で非常に良好な成績であった。

表12 一致率の低い遺伝子型

alleles	sample No.	Low (%)	Middle (%)	High (%)	miss assign
DRB1*1601	H1303	93.0	86.4	86.1	DRB1*1602, (DRB1*1601, *1602)
DRB1*1104	H1302	98.4	91.7	82.9	DRB1*11/1307/14, DRB1*1101
DQB1*0502	H1301/03	100	92.9	100	(DQB1*0502, 0502/0503)
DQA1*0505 (参考)	H1302/05/06	100	71.4	100	DQA1*0501/02, DQA1*0501/03
DQB1*0502	H1105	100		100	
DQA1*0505	H1103/04/06	100	66.7	16.7	DQA1*0501, DQA1*0501/03

遺伝子型	コドン67	DRB5	DQA1	DQB1	コメント
DRB1*1601	TTC	0202	0102	0502	Cauc. (*)
DRB1*1602	CTC	0202	0102	0502	B*6701 (**)

遺伝子型	コドン86	DRB3	DQA1	DQB1	コメント
DRB1*1104	GTG	0202	0505	0301	A*0201-B*3502-C*0401, Cauc. (*)
DRB1*1101	GGT	0202	0505	0301	B*5601, B*4801, B*5101 (**)

(*) : International DNA exchange

(**) : 中島 文明、MHC, vol 8, 2001

表13 過去3年のQC-WSでのクラスII 遺伝子型の一一致率

遺伝子型	第3回(1999)				第4回(2000)				第5回(2001)			
	Lab No.	Low(%)	Middle(%)	High(%)	Lab No.	Low(%)	Middle(%)	High(%)	Lab No.	Low(%)	Middle(%)	High(%)
DRB1	61	99.2	100	98.9	67	99.9	98.6	99.0	64	98.8	96.2	95.7
DRB3/4/5	36	90.8	100	99.4	40	100	92.3	91.6	39	85.3	92.0	99.5
DQA1	11	98.5	100	97.0	14	100	94.7	95.7	13	100	94.3	100
DQB1	36	98.6	100	98.5	43	100	90.1	88.4	43	99.6	98.0	99.4
DPB1	18	97.7	90.0	99.0	20	94.8		94.8	15	99.7	100	99.8

8. 異なる方法の併用と一一致率

異なる方法を併用することがクラスII 遺伝子型の精度を向上させるか否かを検討した(表11)。3種類以上の方法を併用している施設は、DRB1アリルタイピングにおいて、1例のミスタイプが有るのみで、一一致率も99.7%と非常に高率な結果が得られている。DQB1, DPB1アリルタイピングに関しては、100%の一一致率であるが、施設数が2施設以下と限られているのと2種類以下の併用群も良好な成績が得られているため結論を出すには至らなかった。一方、2種類の方法を併用している施設と1種類の方法のみでタイピングを行っている施設では、High resolutionレベルでの結果においても差は認められなかった。1種類の方法でも精度の高いタイピングを行うことが可能であると考えられるが、使用する方

法の組み合わせ等を今後検討する余地が有る。

9. 一一致率の低かったHLAクラスII遺伝子型

今回のQC-WSで一一致率の低かった4種類の遺伝子型を表(12)に示した。特に、Low, Middle及びHigh resolutionタイピングで一一致率が低かったのは、DRB1*1104と*1601で、これらは今回始めて送付された日本人集団には稀な遺伝子型である。DRB1*1104はDRB1*1101のコドン86のみがGGT(Gly)がGTG(Val)に置換されたアリルで、他のクラスII アリルとの連鎖は、DRB1*1101で一般的に認められるDRB 3*0202-DQA1 *0505-DQB1*0301ハプロタイプを形成していると考えられる。白人集団ではA*0201-B *3502-C*0401のクラスI.ハプロタイプと連鎖が認められている。

一方、DRB1*1601の塩基配列は、DRB1*1602

のコードン67のCTC(Leu)からTTC(Phe)の1塩基置換された遺伝子型であるが、他のクラスII アリルとの連鎖は

DRB1*1602と同じくDRB5*0202-DQA1*0102-DQB1*0502である。従って、DRB1*1104, *1601は、他のクラスII アリルとの連鎖でもってDRB1*1101や*1602との比較はできないが、可変部領域であるコードン86或いは67を含むプライマーやプローブで容易にアサイン可能である。

10. まとめ

第5回QC-WSのクラスII タイピングに64施設が参加した。その60%以上の施設がDRB3/4/5, DQB1タイピングも実施し、前回のQC-WSと同様の傾向を示していた。タイピングに使用する方法についても、従来までのWSでの結果とは異なり、各遺伝子座ごとに各施設にマッチした方法を採用している傾向が認められた。クラスIIタイピングに関しては日常業務として定着してきたものと考えられる。表13に過去3年の遺伝子座毎の一一致率を示したが、特に今回のDRB1遺伝子型を除いたクラスII遺伝子座のHigh resolutionタイピングは、過去3年のQC-WSのなかでは最も高い一一致率が選られている。DRB1タイピングに関しても、今回は日本人集団に非常に稀な遺伝子型が含まれていたために、これらの遺伝子型を決定するプライマー或いはプローブ等が準備されていない等の理由で一一致率が低下しているであろう。クラスIIタイピングの全体評価としては、各施設のタイピング従事者の熱意と努力による成果が今回のQC-WSに強く反映され、良好な成績が得られたと判断できる。骨髄移植及び臓器移植の臨床面においても、正確で且つ高精度のHLA遺伝子型と移植成績との関連が論議されようとしている時期でもあり、タイピングに従事している我々の責務が問われようとしていることを肝に銘じてさらなる奮闘を期待する。

Ambiguityの記載方法の原則について

木村彰方¹⁾, 徳永勝士²⁾, 柏瀬貢一³⁾, 小河原悟⁴⁾, 斉藤 敏⁵⁾, 成瀬妙子⁶⁾,
橋本光男⁷⁾, 丸屋悦子⁸⁾, 屋敷伸治⁹⁾, 平田蘭子¹⁰⁾, 前田平生¹⁰⁾
(HLA標準化委員会)

- ¹⁾ 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態, ²⁾ 東京大学大学院人類遺伝学, ³⁾ 日赤中央血液センター検査三課,
⁴⁾ 福岡大学医学部第4内科, ⁵⁾ 信州大学医学部法医学, ⁶⁾ 東海大学医学部分子生命科学系,
⁷⁾ 兵庫県立西宮病院腎移植センター, ⁸⁾ 京都府赤十字血液センター研究部, ⁹⁾ 鹿児島大学医学部ウイルス学,
¹⁰⁾ 埼玉医科大学総合医療センター輸血・細胞治療部,

HLA-DNAタイピングでは種々の原理に基づく方法論が用いられているが, その多くは多型が集中するエクソン領域に限っての解析である。また, 毎年約50の新しいクラスIIアレルと約120の新しいクラスIアレルが報告されており, その増加のペースはこの数年来にぶることなく一定している。このため, 現時点において, 個々人のHLAアレルを単一のアレルとして特定することはタイピング法の原理上不可能に近い。従って, 具体的にHLAタイピングを行った場合, 区別出来ないアレルないし区別出来ない遺伝子型(アレルの組み合わせ)が存在することが多い。そこで, このようなAmbiguity(不確かさ)の場合のタイピング結果(報告)の標記法について, 以下のように提案する。なお, いずれの場合とも, 区別出来ないアレル組み合わせ等が存在することをコメントした上で報告するものとするが, この際にアレル頻度を考慮した記載を行うことも可とする。

I. アレルレベルでのAmbiguity (アレルそのものが区別出来ない)

平成12年のQCWSで認められた方式を継続する

例: 4002/06 (4002と4006の2アレルのみが区別不可)

4002/03/06 (4002,4003,4006の3アレルのみが区別不可)

4002/03/+ (4002,4003を代表とする区別出来ないアレルが4つ以上)

II. 遺伝子型レベルでのAmbiguity (アレルの組み合わせが区別出来ない)

原則1: 2桁レベルではAmbiguityにならない場合には2桁記載とする

(平成12年のQCWSで認められた記載法の応用)

例: 1301,5701と1304,5701と1304,5703のAmbiguityは13,57と記載

原則2: 2桁レベルでもAmbiguityになることがある場合の記載について

例: 3501,5101と3511,5109と5301,7802

区別不可能な組み合わせの代表アレルに「/+」をつけて, アレルとして記載

上記の例では, 3501/+と5101/+を, それぞれのアレルとして記載

2. 方法別報告 I

DYNAL-SSPの評価

樋口 香織

長崎県赤十字血液センター, 検査課

1. はじめに

Dynal-SSP は液状バルクプライマーのみのDynal Classic SSP と凍結乾燥プライマーミックスがすでにPCRチューブに分注され、マスターミックス付の Dynal AllSet SSP に分別される。前者はさらに2桁レベルのタイピングが可能な Low resolution (50tests) と4桁レベルのタイピングが可能な High resolution (25tests) に分かれており、クラス I, クラス II を幅広くカバーしているキットである。

2. 参加施設

参加施設は17施設 (ABC : 7, DR : 15, DQ : 5) で、そのうち15施設からスコアデータが提出された (表1)。Low resolution を使用している施設 (上から6施設) とHigh resolution を使用している施設に分けられるようであった。Dynal AllSet SSP は1施設のみであったため、解析の対象から除外した。

3. 反応・判定結果

Low resolution

表2にDRB1タイピングの結果を示す。ロットは5種類あったがプライマーの数、特異性は同じであった。プライマーNo.14がfalse negative であったためにH1302のDRB1*12をタイピングできなかった施設があった。このプローブは他のロットでも一施設でスコア4と弱い反応を示しており、判定に注意を要するプライマーだといえよう。

その他 スコアは正しいが、判定 (記入?) ミスと考えられるH1303のDRB5を53と記入した施設があった。この施設はDRB3,DRB4,DRB5を血清学的表記法で記入していた。DRB3,DRB4,DRB5については、ただ○を記入したり、B3*, B5*などの表記があり、統一性がみられなかった。

表1 Dynal SSP使用施設・検体数

施設番号	Low resolution				A*					B*	C*	DRB1*					DQB1*				使用キット数					
	A	B	C	DRB1	DQA1	01,3,11	02	09	10	40	07	Compd	01	04	08/12	11	15/16	DRB3	DRB4	DRB5		02/04	03	05	06	
9	6	6		6																						5
57	6	6	6	6			4	2						2	2											6
5				6																						1
26				6																						1
48				6																						1
58				6																						1
25					6											2										2
54						3	4	2	1		2	6		2	2	2	3									10
18							4			1				2	2	2	3									6
35							4		1	1				2												4
8								2																		1
29													1	2	2	2	3	3	2	3						8
28														2			3									2
45																1	1									2
34																					1	3	3	1		4
施設数	2	2	1	6	1	1	4	3	2	2	1	1	1	6	4	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	
検体数	12	12	6	36	6	3	16	6	2	2	2	6	1	12	8	9	13	3	2	3	1	4	4	2		

表 2 DYNAL SSP Low resolution

	DR Low resolution BATCH B662	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	31	32	33	
*01	0101/02/05	1																								
	0103		2																							
*15	1501-1508			3																						
*16	1601-1608				4																					
*03	0301/04/05/06/09/11/12					5	6																		17	
	0302/03					5		7																	17	
	0307					5																			17	
	0308					5	6							13												
	0310					5	6																	21		
*04	0401-14/16-32								8																	
	0415								8					13												
*11	1101/03/04/06/09/10/11/12/15/24/27/28/29/32/33													13			16									
	1102/14/16/20/21													13		15	16									
	1105/08/26/30/34													13												
	1107						5							13												
	1113/17													13						18						
	1118/31													13		15										
	1122								8					13											20	
*12	1201/03/04/05																									
	1202															14		14	16							
*13	1301/02/04/08/16/17/22/23/28/31/32/34																15	16	17							
	1303/06/09/12/30/33																15		17							
	1307/11/14/20/21/24/29																	16	17							
	1310																15	17		19						
	1313																15	17			20					
	1315/19/26								7								15	16	17							
	1318																16	17			20					
1327							6									15	16	17								
*14	1401/07/26																		18						21	
	1402/06/13/19/20/29							7											17		19					
	1403/12							7											17		20					
	1404/08/11/28/31																		17		18					
	1405/14/23																		17		18					
	1409/17/21/30																		17		19					
	1410								8																21	
	1415										10														20	
1416																15	16							21		
1418								7											17	18						
*07	0701/03/04									9																
*08	*0801/02/04-08/11/16/17																									
	0803/10/12-15/18/19																									
	0809/21																									
	09012																									
*09	09012																									
*10	1001																									
DRB3	*0101-0303																								31	
DRB4	*0101-0105																									32
DRB5	*0101-0204																									33

High resolution

プライマーの数はアリのルの増加に対応するためにクラス I ではロットで異なることが多く、増加する一方である。重ねて区別できないニューアリのルも増加している。同じプライマーを用いたとしてもロットが異なれば判定結果に記入できるアリのルが異なってくる。A*02についてスコア提出中3種類のロットがあり、表3にロット2種のパターン（一部抜粋）を示す。ロットNo.B385（プライマー24本）ではA*0210があってもA*0206の区別が可能であったが、新しいロットG121（プライマー37本）ではA*0210があるときはA*0206の存在を確定できなかった。また、A*0206とA*0228は全く同じパターンを示し、区別することが不可能であった。

その他High resolution タイピングではスコアの違いは多少あったが、判定に間違いはなかった。DRB1はすべて4桁タイピング可能であった（表4）。

Lab.No	Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	31	32	33	DRB1	DRB1'	B3	B4	B5	Lot.No			
5	H1301				8																					8	16				51	F318		
9	H1301				8																					8	*1601/	-			*02	B065		
26	H1301				8																					8	16	-				B065		
48	H1301				8																					8	1601/				0101/	A764		
57	H1301				8																					8	*1601/				B5*	B662		
58	H1301				8																					8	16	16			○	550.01		
5	H1302													8	8		8									8	11	12	52			F318		
9	H1302													8	8		8									*1101/	*1201/	*0202				B065		
26	H1302													8	8		8									8	11	12				B065		
48	H1302													8	8		8									8	1101/	12	0101/				A764	
57	H1302													8	8		8									8	*1101/	*12	B3*				B662	
58	H1302													8	8		8									8	11		○				550.01	
5	H1303				8																					8	16				53		F318	
9	H1303				8																					8	*1601/	-			*02		B065	
26	H1303				8																					8	16	-					B065	
48	H1303				8																					8	1601/				0101/			A764
57	H1303				8																					8	*1601/				B5*			B662
58	H1303				8																					8	16	16			○			550.01
5	H1304		8	8																						8	01	15				51	F318	
9	H1304		8	8																						8	*0101/	*1501/			*0101			B065
26	H1304		8	8																														

表3 HLA-A2

		Lot. G121 プライマー37本 対応アレルA*02011~*0246																											HLA-A	HLA-A		
Lab.No	PCR Product bp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	37		
		250	240	355	80	130	175	465	130	115	355	240	145	375	230	360	245	130	175	150	175	155	115	220	225	245	150	85	380	230		
	*0201	1	2	3	4	5																										
	*0206	1		3	4	5						11																				
	*0228	1		3	4	5						11																				
	*0210	1		3	4	5						11			15														28			
	*0216	1	2	3	4	5															19											
	*2402/																17		19													
54	H1302	8	8	6	6	8														8											*0216	
57	H1302	8	8	8	8	8														8											*0216	
54	H1304	8		8	6	8					8						2	8		8											*0206/28	*24
57	H1304	8		8	8	8					8							8		8											*0206/	*24
54	H1305	8		6	8	8					8																				*0206/28	
57	H1305	8		8	8	8					8																				*0206/	
54	H1306	8		8	6	8					8					8												6			*0210	-,*0206/28
57	H1306	8		8	8	8					8					8												8			*0210	

		Lot. B385 プライマー24本 対応アレルA*0201~*0226																								HLA-A	HLA-A
Lab.No	PCR Product bp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
		355	230	350	80	125	175	410	140	115	350	235	140	375	220	355	240	125	175	145	170	145	190	215	250		
	*0201	1	2	3	4	5																	22		24		
	*0206	1		3	4	5						11											22		24		
	*0210			3	4	5						11			15						W		22		24		
	*0216	1	2	W	4	5														19		22		24			
	*2402/																	17		19							
18	H1302	8	8	8	8	8														8			8	8	*0216		
18	H1304	8		8	8	8					8							8		8			8	8	*0206	*2402/	
18	H1305	8		8	8	8					8												8	8	*0206		
18	H1306	8		8	8	8					8				8								8	8	*0206	*0210	

4. 問題点

今回DYNAL-SSPの問題点としてはDRB1 Low resolutionでプライマーNo.14がfalse negativeであったことと、HLA-A*02 High resolutionでA*0210があるときはA*0206及びA*0228の確認ができないことであった。A*0210はLow resolution (Dynal Classic SSP, Dynal AllSet SSP)でも区別が可能であるが、A*0210がある場合、その他のA*02の存在を確認できない。HLA-AのLow resolution タイピングを行った2施設ではH1306をA*0210のホモタイプと誤判定していた。判定には存在を否定できないアレルの考慮が必要である。

5. まとめ

DYNAL-SSPは手順が簡単で、短時間に特定のアレルについて少数検体を処理するのに適している。しかし、プライマーの分注に手間がかかるため、多

量の検体を処理するには不向きである。また、バンドの濃さがプライマーによって異なっていたり、False Positive バンドがあるため判定にはある程度のなれが必要である。今回の結果はほぼ良好であった。

High resolution キットは25テストであるが、それでも少数検体の確認検査にしか使用しない小規模ラボでは単位数が多いと考えられる。最新のキットで測定できればよいが、施設所有の古いキットで検査してきた施設もあり、プライマーが異なっているために比較検討も難しかった。自施設のキットがどこまでアレルを判定可能か考慮に入れて使用すべきである。近年のアレルの増加は目覚しくSSPキットはそれにあわせ、さらにプライマーを増加させる必要がある。プライマー改良のためか、DYNAL-SSP High resolution はキットによって、注文後納期が数ヶ月かかることもあり、メーカー側にニューアレルへのすばやい対応と、少数検体キットを要望したい。

表 4 DRB1 High Resolution

DRB1*04

Lab.No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	21	DRB1	DRB1'	Lot. No.
*0401	1			4			7	8	10									
*0402		2		4				8	10				14					
*0403			3					8	9	10								
*0404				4				8	9	10								
*0405				4	5		7		9									
*0406			3			6		8	9	10								
*0407			3				7		9	10								
*0408				4			7		9	10								
*0409	1			4	5		7											
*0410				4	5			8	9									
18 H1305				8	8		8		4							*0405		F427
35 H1305				8	8		8		8							*0405		F040
28 H1305				8	8		8		8							*0405		F276
9 H1305				8	8		8		8							*0405		A946
29 H1305				8	8		8		8							*0405		A664
54 H1305				8	8	2	8		6							*0405		A335
18 H1306			8			8		8	8	8						*0406		F427
35 H1306			8			8		8	6	6						*0406		F040
28 H1306			8			8		8	8	8						*0406		F276
9 H1306			8			8		8	8	8						*0406		A946
29 H1306			8			8		8	8	8						*0406		A664
54 H1306			8			8		8	8	8						*0406		A335

DRB1*08/12

Lab.No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	DRB1	DRB1'	Lot. No.		
*1201				4		6		8	9	10		12					
*12021			3			6		8	9	10		12					
*12022			3			6		8		10		12					
*12032				4		6		8				12					
*1204		2		4		6		8	9	10	11	12					
*1205				4		6		8	9	10							
9 H1302				8		8		8	8	8		8			*1201		B525
18 H1302				8		8		8	8	8		8			*1201		A739
54 H1302				8		6		8	8	8		8			*1201		A286
18 H1306				8		8		8	8	8		8			*1201		A739
54 H1306				8		6		8	8	8		8			*1201		A286

DRB1*11

Lab.No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	DRB1	DRB1'	Lot. No.
*1101	1			3		5		7											
*1102	1			4		6		8											
*1103	1		3			6		8											
*1104	1		3		5			8											
*1105		2	3		5		7												
*1106	1		3		5			8			11								
*1107	1							8	9										
*1108	1			5		7					11								
*1109	1		3		5		7					12	13						
*1110	1		3		5		7					12		15					
18 H1302	8		4		4			6								0	*1104		A673
29 H1302	8		8		8			8								0	*1104		A673
54 H1302	8		8	2	8			8								2	*1104		A553
18 H1305	8		6		6		6									0	*1101		A673
29 H1305	8		8		8		8										*1101		A673
54 H1305	8		8		8	2	8						2			2	*1101		A553

DRB1*15/16

Lab.No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	DRB1	DRB1'	Lot. No.		
*1501	1		3		5					10		12						
*1502	1		3							9	10		12					
*1503	1	2	3		5								12					
*1504	1			4	5								12					
*1505	1				5						11	12						
*1506	1	2	3		5					10		12						
*1507	1		3		5	6				10		12						
*1508	1		3					8	9	10		12						
*1601				4		6			9			12						
*1602					6				9		11	12						
*1603				4		6	7			9								
*1604				4		6		8		9		12						
*1605			3			6				9	10		12					
*1607			3			6				9	10		12	13				
*1608				4		6	7			9			12					
18 H1301						8			8		8	8				*1602		A600
28 H1301						8			8		8	8				*1602		F301
29 H1301						8			8		8	8				*1602		B954
54 H1301						8			8		8	8				*1602		F509
18 H1303				8		8			8			8				*1601		A600
28 H1303				8		8			8			8				*1601		F301
29 H1303				8		8			8			8				*1601		B954
54 H1303				6		8			8			4				*1601		F509
18 H1304	8		8		8					8		8				*1501		A600
28 H1304	8		8		8					8		8				*1501		F301
29 H1304	8		8		8					8		8				*1501		B954
54 H1304	8		8		8					8		4				*1501		F509

Micro-SSPの評価(解析)

男山 順子

熊本県赤十字血液センター, 検査課

1. はじめに

Micro-SSPキットにはClass I用、Class II用、Class I+II用があり、また各々に複数のLotが存在する。

2. 参加施設・方法

キット毎の参加施設は、以下のとおりである。

Class I + II	SSPJPN	LotNo. 002	7施設
Class I	SSP 1 L	LotNo. 003	9施設
		LotNo. 002	1施設
Class II	SSP 2 L	LotNo. 03A	6施設
		LotNo. 004	4施設
	SSP 2 H	LotNo. 002	1施設
	SSP 2 Q	LotNo. 02A	1施設
LotNo. 003		1施設	

転記ミスが考えられたデータについては該当施設に問い合わせ後修正を行なった。

3. 判定結果

サンプル1301についてはC-locusに*04・*06・*12・*15の4抗原がタイプされ(表1)、B*27のミス(表2)があった。サンプル1302ではA*03のミス(表3)があった。サンプル1301の場合、SSP 1 LキットにおいてLotNo.003ではCw*12とCw*04判定されるがLotNo.002ではCw*0603が否定できないため、3抗原の可能性となり、SSPJPNでも同様にCw*04・*06・*12・*15のアサインとなった。

B*27とA*03のミスアサインはそれぞれ1箇所しかないプローブが反応していないためであった。

サンプル1303でもC-locusに*06・*13・*12・*18の4抗原がタイプされた(表4)が、SSP1LのLotNo.003ではCw*06と共に10Aの*1207が否定で

きず、LotNo.002では12Hの*1301が否定できなかった。SSPJPNでも*06・*12・*18が考えられた。

サンプル1304ではSSPJPNでB*07とB*35/18とタイプした施設があったがB*18が*07と*35に重なっているためである。

サンプル1301と1303のClass IIにおいてDRB1*1510/1602あるいはDRB1*1510/1601と判定した施設があったが、SSP 2 LキットのLotNo.#03Aにはない*1510がLotNo.004の1Dに存在するためである。

サンプル1305ではB-locusにB*35とB*5901/5502と判定した施設があったが、これは弱反応データをメーカー配布の自動解析ソフトにより判定した場合に起こってくると思われた(表7)。

4. 問題点

データ回答時に転記ミスが見られた施設があったり、DNAタイプを血清学的タイプに変更している施設がみられ、注意が必要である。

弱反応のデータをメーカー配布の自動判定ソフトで判定する場合、タイプが確定できず可能性のあるタイプがすべて判定されてくるので目視による確認が必要である。

プローブが1箇所しかない場合には、その一箇所が反応しないことで誤判定となる可能性があることや、複数のタイプが判定される可能性のプローブの存在も含め、メーカーに改良をお願いしたい。使用側も一方法のみで判定するのではなく、複数の方法による検査が望まれる。また使用キットの違いあるいはLotの違いによりタイピング結果に差がある事を考えるとそのLotにどのような特徴があるかを熟知しキットを使用すべきと思われる。

表1 Class1 1301のCw*について

Lot SSP1L 003				Lot SSP1L 002				SSPJPN 002			
10B	+	Cw*1202		10B	-			7B	+		
10A	-	Cw*0602-05	1203-07	10A	-			7A	-		
11H	-			11H	-			8H	-		
11G	-			11G	-			8G	-		
11F	-			11F	+	Cw*04	Cw*0603	8F	-		
11E	+	Cw*04		11E	+	Cw*04		8E	+	Cw*04	Cw*06 Cw*15
11D	+	Cw*04	Cw*0605	11D	-			8D	+	Cw*04	
11C	+	Cw*04	Cw*12	11C	-	Cw*0602/04		8C	-		
11B	+	Cw*0605	Cw*12	11B	-			8B	-	Cw*0602/04	
11A	-	Cw*0602/03/04		11A	-			8A	-		
12H	-			12H	+	Cw*0602/03/04	Cw*12	9H	-		
12G	-			12G	+	Cw*04	Cw*12	9G	+	Cw*12	Cw*06 Cw*15
12F	-			12F	+	Cw*04	Cw*12	9F	+	Cw*04	Cw*12 Cw*15
12E	-			12E	-			9E	-		
12D	-			12D	-			9D	-	Cw*15	
12C	-			12C	-						
12B	-			12B	-						
12A	+	Cw*04	Cw*1204	12A	+	Cw*04					

表2 《1301》 B*27の判定ミス 表3 《1302》 A*03の判定ミス

SSPJPN002

施設	5B	B*27/81/+
49	8	B*27
61	8	B*27
55	4	B*27
33	6	B*27
16	8	B*27
40	1	
29	8	B*27

B*47

SSP1L 003

施設	1D	A*0301/+
17	8	A*03
43	8	A*03
29	8	A*03
32	1	
54	4	A*03
19	8	A*03
16	8	A*03
33	8	A*03

表4 《1303》のCw*06と*1301・1205・1801について

Lot SSP1L 003				Lot SSP1L 002				SSPJPN 002			
10B	-	Cw*1202		10B	-			7B	-		
10A	+	Cw*06	Cw*1207	10A	-			7A	-		
11H	-			11H	-			8H	-		
11G	-			11G	-			8G	-		
11F	-			11F	-			8F	-		
11E	-			11E	-	Cw*0603		8E	-		
11D	-			11D	-			8D	-		
11C	-	Cw*1202/03/04/06		11C	+	Cw*0602/04		8C	-		
11B	-	Cw*1202		11B	-			8B	+	Cw*0602/04	Cw*1801/02
11A	+	Cw*06		11A	-			8A	-		
12H	+	Cw*06	Cw*1203	12H	+	Cw*12	Cw*1301	9H	-		
12G	-			12G	-	Cw*12		9G	+	Cw*0602	Cw*1205
12F	-			12F	-			9F	-	Cw*1202/03/04/06	
12E	-			12E	-			9E	-		
12D	-			12D	-			9D	-		
12C	-			12C	-						
12B	-			12B	-						
12A	-	Cw*1204/05		12A	-						

表5 《1304》 B*18について

SSPJPN

3G	+	B*07	
6H	+	B*07	B*35
6G	+	B*18	B*35
6F	+	B*18	B*35
7G	+	B*07	
7F	-		
7E	-		
7D	+	B*07	
7C	-		
7B	+	B*07	B*18

表6 《1301》 《1303》 DRB*1510/1602について

SSP2L

Lot SSP2L 004				Lot SSP2L #03A			
	DRB1*	DRB1*		DRB1*	DRB1*		
1H				1H			
1G	-			1G	-		
1F	-			1F	-		
1E	-	*1501-09		1E	-	*1501-08	
1D	+	*1510	*1601-08	1D	+	*1507	*1601-08
1C	-			1C	-		
1B	-			1B	-		
1A	-			1A	-		

施設であった(表1)。

3. 現在, ユニトレイには低~中程度の解像度をもつタイピングトレイと高解像度をもつタイピングトレイとに大別される。今回, 組織適合性学会にて提示されたコンセンサスアリルをもとに一致率をみると, どのアリルについても良好(100%)な結果が認められた。今回, 使用されたキットのLotがかなり異なっていることもあり, すべてを同じカテゴリーにて比較するのは困難であるが, 同一Lotであ

るクラスIABCについてのreaction patternを(表2)に示す。H1305で若干のエキストラ反応がみられた。

4. 今回の結果についてはクラスI, IIともにコンセンサスHLAデータと良好な一致率を認めた。大きな問題点は少ないと思われるがプライマーの増幅サイズによりバンドの判定に注意が必要と考えられた。

表1 Pel-Freez DNA Typing Kit 「UniTray」の検討

各施設の使用キット(ロット)一覧

H13-No	Class I Kit			Class II Kit	備考
	ABC Lot#	B*15 Lot#	B*40 Lot#	DR/DQ Lot#	
34	020-2	001-2* ¹	001-2* ²	011-1	*1:H1301/06に併用 *2:H1306に併用
60	020-2	—	—	—	
7	018-3* ³	—	—	—	*3:H1301/02/04/05に使用
	020-2* ⁴	—	—	—	*4:H1303/06に使用
32	—	001-2* ⁵	—	—	*5:H1301/06に併用 (メインは他社キット)
61	019-?	—	—	011-1	

注:—は未使用

表2Pel-Freez HLA-ABC SSP「UniTray」 Low Resolution Typing Reaction Pattern

Alleles B*

sample	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	56	
H1301 - 34	6	6									6						6																
60	8	8									6						8																
H1302 - 34	6																																
60	8																																
H1303 - 34	6																				8												
60	8																				8												
7	8																				8												
H1304 - 34	8	8																			8	8											8
60	8	8																			8	8											8
H1305 - 34	8	8																			8	8											
60	8	8								8											8	8											
H1306 - 34	8										8	8													8		8						
60	8									8	8													8		8							
7	8									8	8													8		8							

sample	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	assign
H1301 - 34	6						6										15, 27
60	8						8										15, 27
H1302 - 34				6	6										6		51, 51
60				8	8									8			51, -
H1303 - 34																	37, 37
60																	37, -
7																	37, -
H1304 - 34							8	8									07, 35
60							8	8									07, 35
H1305 - 34	8							8							8		35, 59
60	8							8						8			35, 59
H1306 - 34																	15, 40
60																	15, 40
7																	15(62or1557) . 40(61)

Dynal RELI(A,B,DRB,DQB)の評価

橋口裕樹, 西中優子, 友松哲夫

福岡赤十字病院, 臨床検査部

1. はじめに

Dynal RELIはreverseSSO法の原理に基づき, 5'側をbiotinで標識したprimerを用いてPCRを行う。増幅したPCR産物を1本鎖に変性後, sequence specific oligonucleotide probeが固定されている nylon membrane strip上でhybridizationする。その後, horseradish peroxidase(HRP)をラベルしたstreptavidinを加え, tetramethyl benzidine(TMB)基質で発色反応させ, 原則として2桁レベルのallele決定を行う。試薬はプローブ発色試薬セットとA,B,Cw,DRB,DQBのプローブセットから構成されており, 少量検体から大量検体処理等にも適したキットである。

2. 参加施設・方法

参加64施設のうちHLA-A 16施設(25.0%), HLA-B 14施設(21.8%), HLA-DRB 18施設(28.1%), HLA-DQB 4施設(6.3%)の参加があった(図1)。これらの参加施設を対象に, 解析をした。

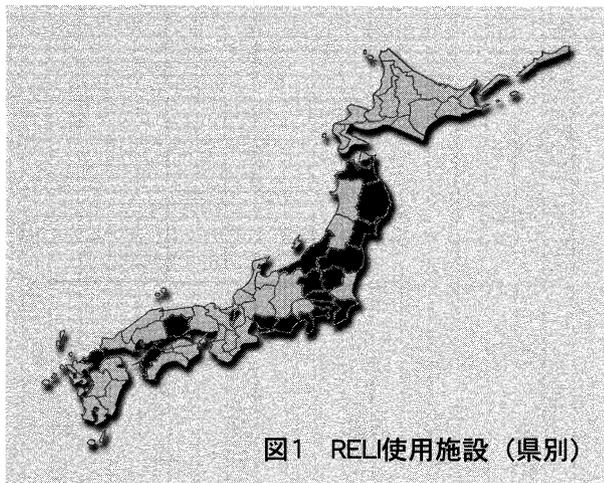


図1 RELI使用施設 (県別)

3. 反応・判定結果

a.解析方法

各施設から回収したスコアシートに記入してある結果を基に, 結果の一致率を算出した(表1)。算出にあたってはスコアシートに記入結果をLow, Medium, Highに分類し, 分類ごとの一致率を算出した。

分類条件は以下に示す通りである。

- Low 血清レベルの2桁が同定されたもの
- Medium 正解アリルを含むグループに分類
- High 4桁以上のアリルに確定されたもの

今回, 使用したキットのプローブ特性については, 1~8にスコア化した数字を各プローブの発色強度とし, 発色の強弱を解析した(表2)。また, 今回の解析結果については, 試薬ロットが多種類使用されていた為, 試薬ロット間差は加味していない。

b.判定結果

不一致例

HLA-A 35probe (17,35:control)

- Low level
#1306 (0206,0210)
→(02,23)
- Medium level
#1305 (0206,2601)
→(0206/10/21, 2603/06)
- High level
#1306 (0206,0210)
→(0206,blank)
→(0210,blank)

HLA-B 56probe (27,56:control)

• Medium level

#1305 (3501,5901)

→(3501or5301,5901)

→(5301/05,5901)

HLA-DRB 36probe (36:control)

DRB1

• High level

#1302 (1104,1201)

→(1101,1201)

#1303 (1601,blank)

→(1602,blank)

→(1602,1502)

#1306 (0406,1201)

→(0403,1201)

DRB3/4/5

• Low level

#1305 DRB4 (0103)

→B4 *表記方法に問題あり

• High level

#1302 DRB3 (0202)

→(0101,0202)

→(0201,)

#1305 DRB3 (0202)

→(0201,)

HLA-DQB1 25probe (25:control)

• High level

#1306 (0302,blank)

→(0302,0303)

B	Low	Medium	High
#1301*1506	100	100	100
#1301*2704	100	—	100
#1302*5101	100	—	100
#1302			
#1303*3701	100	100	100
#1303			
#1304*0702	100	100	100
#1304*3501	100	100	100
#1305*3501	100	83	100
#1305*5901	100	—	100
#1306*1501	100	100	100
#1306*0303	100	100	100

DRB1	Low	Medium	High
#1301*1602	100	100	100
#1301			
#1302*1104	100	100	25
#1302*1201	100	100	100
#1303*1601	100	100	63
#1303			
#1304*0101	100	100	100
#1304*1501	100	100	100
#1305*0405	100	100	100
#1305*1101	100	100	100
#1306*0406	100	100	83
#1306*1201	100	100	100

DRB3/4/5	L	M	H
#1301*(5) 0202	93.8	100	100
#1301			
#1302*(3) 0202	100	75	50
#1302			
#1303*(5) 0202	93.8	100	100
#1303			
#1304*(5) 0101	100	100	100
#1304			
#1305*(3) 0202	100	100	75
#1305*(4) 0103	93.8	100	—
#1306*(3) 0101	100	100	100
#1306*(4) 0103	93.8	100	—

表1 アリル別一致率(%)

A	Low	Medium	High
#1301*1101	100	100	100
#1301*2402	100	100	100
#1302*0216	100	—	100
#1302*0301	100	100	100
#1303*0101	100	100	100
#1303			
#1304*0206	100	100	100
#1304*2402	100	100	100
#1305*0206	100	100	100
#1305*2601	100	92	100
#1306*0206	100	100	67
#1306*0210	94	100	67

DQB1	Low	Medium	High
#1301*0502	100	100	100
#1301			
#1302*0301	100	100	100
#1302			
#1303*0502	100	100	100
#1303			
#1304*0501	100	100	100
#1304*0602	100	100	100
#1305*0302	100	100	100
#1305*0401	100	100	100
#1306*0302	100	100	50
#1306			

表2 プローブ別発色強度 (%)

プローブ発色強度 A

probe no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
pos (n)	64	35	0	48	64	36	0	16	16	96	16	64	32	32	32	0	78	2	48	64
average	6.4	7.8	—	7.0	7.8	7.7	—	7.3	5.5	7.9	5.1	7.6	5.0	7.6	7.1	—	4.9	2	6.6	7.6
false (n)	0	3	—	0	0	4	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	2	0	0
false (%)	0	8.6	—	0	0	11	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	100	0	0

probe no.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
pos (n)	2	64	80	17	7	1	64	32	18	48	16	66	16	48	84
average	3	7.4	7.6	7.8	3.7	4	7.5	8.0	7.0	7.5	8.0	7.8	7.1	7.6	4.7
false (n)	2	0	0	1	7	1	0	0	2	0	0	2	0	0	—
false (%)	100	0	0	5.9	100	100	0	0	11	0	0	3.0	0	0	—

プローブ発色強度 B

probe no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
pos (n)	16	0	43	2	0	70	42	56	28	16	0	42	42	42	1	49	14	14	0	0
average	6.3	—	7.8	3.0	—	6.9	7.6	7.8	7.2	7.3	—	7.8	8.0	7.2	2.0	7.2	7.7	8.0	—	—
false (n)	2	—	1	2	—	0	0	0	0	2	—	0	0	0	1	7	0	0	—	—
false (%)	13	—	2.3	100	—	0	0	0	0	13	—	0	0	0	100	14	0	0	—	—

probe no.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
pos (n)	14	0	0	28	28	54	72	28	18	14	41	0	14	13	14	0	15	30	14	14
average	7.1	—	—	7.5	6.8	6.7	4.0	7.6	7.4	6.1	6.0	—	5.3	6.3	7.4	—	7.5	7.4	5.3	7.4
false (n)	0	—	—	0	0	0	—	1	4	0	0	—	0	0	0	—	1	2	0	0
false (%)	0	—	—	0	0	0	—	3.6	22	0	0	—	0	0	0	—	6.7	6.7	0	0

probe no.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
pos (n)	42	14	0	0	1	70	14	14	16	28	45	1	16	0	19	72
average	7.3	7.0	—	—	4.0	7.7	8.0	7.6	6.9	8.0	7.2	8.0	6.6	—	7.4	4.5
false (n)	0	0	—	—	1	0	0	0	2	1	3	1	3	—	5	—
false (%)	0	0	—	—	100	0	0	0	13	3.6	6.7	100	19	—	26	—

プローブ発色強度 DRB1

probe no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
pos (n)	17	51	34	34	0	34	0	0	34	17	50	17	0	34	0	19	0	0	34	17
average	8.0	7.1	7.0	7.4	—	7.4	—	—	7.4	7.5	7.8	7.1	—	7.0	—	7.2	—	—	7.1	7.6
false (n)	0	0	0	0	—	0	—	—	0	0	0	0	—	0	—	2	—	—	0	0
false (%)	0	0	0	0	—	0	—	—	0	0	0	0	—	0	—	11	—	—	0	0

probe no.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
pos (n)	34	0	17	34	0	17	36	0	0	34	0	34	0	0	68	78
average	8.0	—	7.3	7.6	—	7.9	7.1	—	—	5.9	—	5.9	—	—	7.8	4.0
false (n)	0	—	0	0	—	0	2	—	—	0	—	0	—	—	0	—
false (%)	0	—	0	0	—	0	5.6	—	—	0	—	0	—	—	0	—

プローブ発色強度 DQB1

probe no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
pos (n)	9	10	3	0	9	10	12	0	0	6	3	3	6	3	0	6	5	0	3	9
average	8.0	8.0	6.7	—	7.8	8.0	8.0	—	—	8.0	8.0	6.7	6.7	8.0	—	7.3	8.0	—	6.7	8.0
false (n)	0	1	0	—	0	1	0	—	—	0	0	0	0	0	—	0	2	—	0	0
false (%)	0	10	0	—	0	10	0	—	—	0	0	0	0	0	—	0	40	—	0	0

probe no.	21	22	23	24	25
pos (n)	3	9	12	0	12
average	8.0	8.0	8.0	—	4.2
false (n)	0	0	0	—	—
false (%)	0	0	0	—	—

4. 問題点

1. プローブの発色強度を比較すると、プローブによっては、発色強度が弱いものが若干、認められる。陽性の基準として、コントロールプローブより強い発色の場合となっているが、陽性プローブのスコアがやや弱い傾向にあるために、判定に迷うケースが生じてくる。疑陽性、疑陰性が出現しやすいプローブを考慮し、判定する必要がある。
2. 以前より指摘されていたB54が存在する時、B55/56の区別がつかない点は、解決していない。比較的、日本人に認められるタイプなので考慮しなければならず他法にて確認が必要となってくる。
3. 長いストリップでは、ストリップの歪みが生じてハイブリ時に、溶液に浸透していない場合がある。均一に溶液に浸透しているか注意が必要である。

5. 考察

上記にあげた問題点をクリアすれば、特に煩雑な操作もなく少量検体から大量検体まで対応するバランスのとれたタイピング方法だと考えられる。今回の、解析結果でも2桁レベルの結果では、ほぼ100%に近い一致率が認められた。

今回の解析で特に感じた点として、

1. 結果表記法の統一

表記法の誤記の施設があり、『アレル表記法と結果報告の原則について2000』MHC Vol.7 No.2 131～を参考にして頂きたい。表記法不備は解析時に一致と取るか不一致と取るか、解析者によって解釈が違い、一致率の数字までに反映してしまう。

2. 解析方法の統一化

多数の施設において、複数の方法によりアレルの決定が行われている。こうした場合、厳密に各方法別の生データの判定結果記入がないと、方法別の判定結果の比較作業が困難になってしまう。総合判定結果とは別に必ず、方法別に判定結果を記入して頂きたい。

INNO-LiPAの評価

中島文明

神奈川県赤十字血液センター、検査部

1. はじめに

Innogenetics社（ベルギー）が開発したr-SSOによるHLAタイピング・キットINNO-LiPAは、日本では早い時期から紹介された検査試薬である。ニトロセルロースメンブレン上の横向きライン状にプローブを貼り付け、それを縦方向の細い短冊状に切断したストリップを用いる。LiPAとはLine Probe Assayの略である。これにピオチン化したPCR産物をハイブリダイズして、アルカリ下でストレプトアビチンを反応させ発色により検出する方法である。したがって、特別な機器は必要としない。製

品は表1に示したごとくHLA-A, B, C, DRB1, DRB1345, DQB1, DPB1の7種類で、HLA全領域をほぼカバーしている。また、判定においてもLiPA-Expert HLAというソフトウェアがサポートされており簡便に結果を導くことが可能である。

2. 参加施設・方法

参加施設は3施設のみであった。施設番号31がHLA-A, B, C, DRB1345, DQB1, DPB1, 施設番号54がHLA-A, B, DQB1, 施設番号37がHLA-Bを扱っていることから別施設・同一検体で比較できるデー

はあった(表2)。

プローブではNo.30の反応性がやや弱い。これはA*0216を決定するプローブであるため重要なところである。また、プローブNo.32は偽陽性というほどではないものの弱冠の反応が認められた。このキットにはプローブの塩基配列と位置に関する情報は記載されていないが、反応パターンから推測される配列は、プローブNo.32の場合355A----G362となる。これはA10グループをキャッチするプローブであり、反応が認められた検体はA*02を持っており、同位置の配列が355G----G362であることからクロス・ハイブリダイゼーションが生じたものと推測される。

判定結果は一部High Resolutionで得られるが、ほとんどは2桁のLow Resolutionにとどまる。

2) HLA-B

Bローカスでは3施設の比較となるが、施設番号37の反応が全体的に不安定で2検体において結果が導かれていない。その他の判定結果では表記方法の違いはあるものの各施設間での相違は認められなかった(表3)。

プローブではNo.1, 4, 13, 22, 30, 48, 52, 56の反応性が弱い。特にプローブNo.1は反応スコア2から4と極めて弱い。しかも、このプローブは日本人に多いB40グループを押さえるため、このままでは日本人をタイプするには問題であり是非とも改善を望みたい。プローブNo.18は#H1302において施設番号37のみが偽陽性を示しているが、他の2施設が陰性であることから、これは全くのテクニカル・エラーとではないかと考えられる。

Bローカスは60プローブで判定するため解像度は比較的高い。しかしながら、反応性の弱いプローブも多く、確実な手技で臨まないと結果が得られない場合もあることが再認識すべき事項であると考えられる。

3) HLA-DQB1

DQB1領域は対立遺伝子の総数もさほど多くなく、どのプローブもクリアな反応を示していたため、今回の6検体では解像度も高く全く問題なく判定されていた(表4)。

4) その他

その他、表には示していないが、C, DRB1345, DPB1キットに1施設が参加しているが、どれも問題なく結果が得られている。Cローカスは全体的に反応が弱いと判定に支障をきたすほどではない。DRB1345, DPB1も一部のプローブで反応性の弱いものがあるが問題なく判定できている。

4. 問題点・まとめ

プローブを用いる検出方法は手技が確実でないと正しい結果を得ることが困難になると考えられる。

- ① DNAの濃度や純度は適正であるか
- ② PCR産物は十分に得られているか
- ③ 反応温度, 反応時間, 反応液の量は適正であるか
- ④ 洗浄温度, 洗浄時間, 洗浄液の量は適正であるか
- ⑤ 確実にハイブリダイズしているか
- ⑥ 十分に洗浄されているか

といったようなことの、どれひとつでも欠ければ反応が不安定となり発色すべきところも発色しなくなってしまうであろう。本キットは偽陰性が出にくい印象があり、十分に反応させれば結果が得られると考えられる。また、プローブ1ヶ所のミスはソフトウェアで忠告メッセージが得られるようになっていて、これを活用すれば多少のことはカバーできる。

ソフトウェアに関しては定期的にアリル・データ・ベースの更新が行われており最新の情報で結果が得られる。しかしながら、プローブ数は変化がないため、前回High Resolutionで得られた結果が、今回は2桁のLow Resolutionに留めざるをえなくなる場合が多々ある。こういった、試薬レベルのAmbiguityの増加は、どのタイピング・キットでも問題ではないだろうか。さいわい、単一民族の日本人に有利な点として、遺伝子頻度でフィルターを通せば便宜上の結果は得られるが、これも根本的な問題解決には至っていない。

最後に、本キットは多少コスト高な点を除けば、HLAのほとんどの領域を同一の手順で簡便に検出可能で極めて扱い易いと考える。要望としては、プローブの反応性の改善、プローブの組み合わせの更新をさらに積極的に行ってもらいたいものである。

表4 HLA-DQB1の反応と判定結果

検体番号	施設 番号	プローブ No.																				判定結果		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	HLA-DQB1	HLA-DQB1
#H1301	31		8		8						8											8	*0502	
	54		8		8						8											8	*0502	*05031 or -
#H1302	31															8	8						*0301	
	54															8	8						*0301/09	-
#H1303	31		8		8						8											8	*0502	*05031 or -
	54		8		8						8											8	*0502	
#H1304	31	8			8				8				8	8						8	8	*0501	*0602/11	
	54	8			8			8				8	8						8	8	*05011	*0602/11		
#H1305	31	8		8	8										8							*0401	*0302/07	
	54	8		8	8										8							*0401	*0302/07	
#H1306	31	8													8							*0302/07		
	54	8													8							*0302/07	-	

(反応スコア1は空白で表示)

PCR-MPHの評価

大熊 重則

岡山県赤十字血液センター

1. はじめに

PCR-MPH試薬は、マイクロプレートを使用したreverse SSO法を原理とする方法で、大量検体にも汎用できる利点を有し、現在血液センターを中心に広く使用されている。今回13施設から提出されたMPHのデータをもとに各試薬の評価を行った。

2. 参加施設・方法

各使用試薬名、データ提出数を表1に示す。提出された生データのスコアから、各プローブの発色強度、コンセンサスタイプに対する結果の不一致の理由等を解析した。

3. 反応・判定結果

1) Class Iキットの評価

a) HLA-A

1施設において、H1301(コンセンサスタイプ：A11,24, 以下同)をA11,-, H1302(A2,3)をA2,-, H1304(A2,24)をA2,-とミスタイプしていた。また、H1302は別の1施設においても同様のミスタイプが認められた。いずれも、A24に対するプローブ(No.4,5,6), A3に対するプローブ(No.3)の発色不良によるものであった。

b) HLA-B

表1 使用試薬名と参加施設数

<i>Class I</i>				<i>Class II</i>			
使用試薬名	判定レベル	使用Lot	参加施設数	使用試薬名	判定レベル	使用Lot	参加施設数
HLA-A	low	ZOC他6種	7	HLA-DR	low	ZOA他3種	13
HLA-B	low	ZOA他5種	6	HLA-DQ	low	ZOC他6種	4
HLA-C	middle	ZOA他3種	7	HLA-DR1	high	VOA他4種	5
HLA-A2	high	ZOC他7種	9	HLA-DRA2	high	ZOC他6種	8
HLA-A26	high	ZOA他6種	10	HLA-DR4	high	ZOA他6種	8
HLA-B40	high	ZOC他6種	9	HLA-DR8/12	high	ZOC他6種	8
HLA-B15	high	ZOC他6種	8	HLA-DR3/11 13/14	high	ZOE他6種	8

H1302-H1306の5検体においては、全ての施設で良好な結果が得られ、2桁レベルで全てコンセンサスタイプと一致していた。しかし、H1301(B*1506,27)において、B15に対するプローブ(No.11)の発色不良が1施設に認められ、2桁レベルでは一致した回答(B15,27)ではあるが正常な発色パターンとは異なるB*1511,27の発色パターンを示していた。

c) HLA-C

1施設において、H1301(Cw*0403,1202)をCw*0202+,1202とミスタイプし、H1302を判定不能とするデータが提出された。これらは、それぞれNo.14, No.6のプローブの発色を陽性と判定しなかったために起こったものと思われる。その施設のOD値を見るとNo.14のプローブでは、cut off値より若干低い程度の発色が認められていた。すなわち、H1301の判定ミスは判定プログラムのcut off値の調整により回避できたのではないかと推測される。H1303-H1306については、全施設において明確な反応パターンを示し、良好な結果が認められた。

d) HLA-A2

H1302,04,05,06について使用され、全ての検体に対し、良好な反応パターンが得られていた。しかし、H1301については、コンセンサスタイプがA*0216であったのに対し、A*0201と判定した施設が2施設あった。このHLA-A2キットではこの2つのタイプの判別は不可能であり、他の方法を用いて

タイピングするか、あるいは、昨年の学会で定められた表記法に基づき、A*0201/09/11+と表記すべき検体であったと思われる。

e) HLA-A26

H1305に対し、全施設で明確な反応パターンが得られ、正確なタイピング(A*2601)ができていた。

f) HLA-B40

H1306に対し、全施設で明確な反応パターンが得られ、正確なタイピング(B*4006)ができていた。

g) HLA-B15

H1301でNo.10のプローブのfalse positiveのため、B15のhigh resolution判定ができなかった施設があった。その他の施設及びH1306については、良好な結果が得られていた。

2) Class IIキットの評価

a) HLA-DR (ジーンカラー)

全ての検体について、全施設のデータは総じて良好であった。H1303(DR*1601)はこのキットではDR15+と判定されるが、全施設で他の方法と併用したためか、DR16とタイプできていた。施設により、No.3,6,10,12のプローブにクロス反応が見られ、No.4のプローブの弱陽性が認められた。

b) HLA-DQ

H1301-H1306について、全施設のデータは総じて良好なものであったが、No.7のプローブの弱陽

性が認められた。

c) HLA Class II high resolution kit

5種類のClass II high resolution kit(DR1,DR2,DR4, DR8/12,DR3/11/13/14)は、全施設で明確な反応パターンが得られ、正確なタイピングができていた。DR2のNo.4のプロープに若干のクロス反応が認められた。

4. まとめ

各MPH試薬の反応性及び判定結果について解析した。Class IIのキットにおいては、low,high resolutionともに、全施設で判定ミスはなく、良好な結果が得られたことから、優れた試薬であると思われる。しかし、class Iのキットにおいては、一部にプロープの発色不良及びfalse positiveによるタイピングミスが認められた。また、プロープにより、弱い陽性反応及びクロス反応が認められたが、これらは判定に支障をきたすものではないと思われる(表2,3)。

一方、施設間差も若干認められ、このキットの使用にあたってはやや熟練を必要とするかもしれないと感じられた。

今回の提出パネルには日本人以外と思われるパネル(H1301-1303)も含まれていた。A*0201とA*0216が判別不能であること、DR*1601がDR15+と判定されるなど、日本人を主なターゲットとしているMPHの弱点も散見されたように思われる。

近々MPHキットはMPH-2としてリニューアルされる予定と聞いている。その内容は、①プロープの改良及び追加による反応性及び解像度の向上、②試薬の改良による操作性の向上、③判定プログラムの改定による判定操作の利便性及び均一性の向上、等である。これらの改良により、今回明らかになった問題点が一掃され、より使いやすいキットになることが期待される。

表2 False negative 及び弱陽性反応が認められたプロープ

Class I					
試薬名					
HLA-A	Probe No.	3	4	5	6
	反応HLA	A3	A24	A24	A24
	スコア	(f.n)1-8	(f.n)1-8	(f.n)1-8	(f.n)1-8
HLA-B	Probe No.	11	12		
	反応HLA	B15	B35		
	スコア	(f.n)1-8	4-8		
HLA-C	Probe No.	2	6	9	19
	反応HLA	Cw3	Cw0704	Cw8	malti
	スコア	4-8	2-8	4-8	4-8
HLA-A2	Probe No.	6	7	8	
	反応HLA	A*0201/06	A*0201/06	A*0201/06	
	スコア	4-8	4-8	4-8	
HLA-B15	Probe No.	10			
	反応HLA	B*1501			
	スコア	4-8			

f.n = false negative

Class II		
試薬名		
HLA-DR	Probe No.	4
	反応HLA	DR4
	スコア	4-8
HLA-DQ	Probe No.	7
	反応HLA	DQ4
	スコア	4-8

表3 False positive 及びクロス反応が認められたプローブ

Class I

試薬名			
HLA-C	Probe No.	13	20
	反応HLA	Cw3	Cw0704
	スコア	1-2	1-4
HLA-A26	Probe No.	4	
	反応HLA	A*2601	
	スコア	1-2	
HLA-B15	Probe No.	10	
	反応HLA	B*1506	
	スコア	1-8(f.p)	

f.p = false positive

Class II

試薬名					
HLA-DR	Probe No.	3	6	10	12
	反応HLA	DR12	DR2?	DR2?	DR12
	スコア	1-2	1-2	1-2	1-2
HLA-DR2	Probe No.	4	7		
	反応HLA	DR*1601	DR16?		
	スコア	1-4	1-2		
HLA-DR4	Probe No.	12			
	反応HLA	DR*0405			
	スコア	1-2			
HLA-DR3 11/13/14	Probe No.	11			
	反応HLA	DR*1104			
	スコア	1-2			

シオノギHLA-DNAタイピングキットの評価

山岡 学, 松崎龍典, 細川美香, 阿部 操, 寺岡敦子

関西医科大学病院, 輸血部

1. はじめに

シオノギHLA-DNAタイピングキットは、クラスI (A, B, C) 抗原を血清学的レベル以上でタイピング可能でありA, B, C各ローカス別に構成されている。SSO法を基本としたMRHA (Microtiter Plate-Reverse Hybridization Assay) 法で、PCR産物とオリゴヌクレオチドプローブを固相したマイクロタイタープレートでハイブリダイゼーションを行い、EIA法により得られた吸光度から陽性、陰性シグナルを決定し、そのパターンから特定の対立遺伝子をタイピングする方法である。

キットの構成は、各ローカスあたりのプローブ数が24、1ローカスあたりの必要DNA量は2 μ lである。Bローカスについては、3抗原以上候補があがった場合、抗原を特定するために8プローブの追加が必要となる。

今回のワークショップでの使用施設数はA, Bローカスで3, Cは2施設であった。

2. スコア化の判定基準

キットに添付されたカットオフ値は各ウエルごとに設定されている。しかし、使用装置により施設間差が生じるため、測定した吸光度をスコア化する必要がある、その基準を示した(図1)。

スコアは8, 6, 4, 2, 1と5段階に分け、基準としてパターン1とパターン2の2種類がある。導入時はパターン2の基準をもちいてスコア化し、データの蓄積とともにパターン1で行うことが望ましいと思われる。スコア化の判定基準は8と6が陽性、2と1が陰性、4が保留となる(表1)。

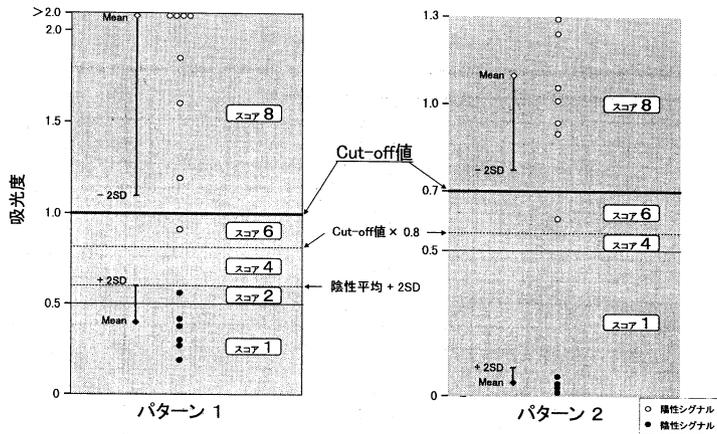


図1 測定値（吸光度）スコア化の基準

表1 測定値スコア化の判定基準

スコア	基準（吸光度）	判定	目視判定（参考）
8	Cut-off値 以上	陽性	陽性
6	Cut-off値 × 0.8 以上	陽性	陽性
4	スコア6と2*の間	保留	保留
2*	陰性平均 + 2SD 以下	陰性	陰性
1	0.5未満	陰性	陰性

*「陰性平均 + 2 SD」の値が0.5以下となる場合は、「スコア2」の区別はなく「スコア1」とする。

3. 判定結果

スコア化した各施設の結果を示した（表2～4）。次にキット添付の自動判定ソフトで判定表示させた結果と、それをもとにHLA標準化委員会のアリル表記法にしたがい表記した（表5）。

今回A, B, CローカスのタイピングにシオノギHLA-DNAタイピングキットを使用した施設にはミスタイプは見られず、血清学的なレベルにおいて全て正解であった。

4. 問題点

キットの問題点として3点あげられた。

- 1) 高価な専用装置がなくても測定可能であるが、使用装置の違いなどから吸光度に施設間差を生じる。
- 2) 製品のラインナップとしてDRタイピングキットがない。
- 3) 自動判定システムで、解析ソフトの処理速度が遅い。

5. まとめ

今回シオノギHLA-DNAタイピングキットを使用したのは3施設であった。

A, B, Cローカス全てにおいてミスタイプは認められなかった。

上記の問題点を考慮しさらなるキットの改善が望まれる。

表2 HLA-A

sample	施設	プローブNo.																								A-1	A-2
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
H1301	4	8	8	8	8	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	8	8	1	1101/02	2402/04	
	64	8	6	8	6	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1	1	1	6	1	6	4	1	1101/02	2402/04	
	3	8	6	8	8	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	4	4	1	1101/02	2402/04	
H1302	4	8	1	8	8	8	1	8	1	1	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	8	8	1	0201/04/06/+	0301	
	64	6	1	8	6	4	1	4	1	1	1	1	1	4	6	1	1	1	1	8	1	2	2	1	0201/04/06/+	0301	
	3	8	1	8	4	6	1	4	1	1	1	1	1	4	4	1	1	1	1	8	1	4	4	1	0201/04/06/+	0301	
H1303	4	8	8	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	8	8	1	0101/02		
	64	6	8	1	4	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	6	1	6	4	2	0101/02	(-)	
	3	8	8	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	4	4	1	0101/02	0101/02	
H1304	4	8	8	8	8	1	1	8	1	1	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	8	1	0201/04/06/+	2402/04/07	
	64	8	6	4	8	1	1	4	1	1	1	1	1	2	6	1	1	1	6	1	1	4	1	0201/04/06/+	2402/04/07		
	3	8	4	4	8	1	1	4	1	1	1	1	1	4	4	1	1	1	4	1	1	4	1	0201/04/06/+	2402/04/07		
H1305	4	8	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	8	8	8	0201/04/06/+	2601/02/03/+		
	64	8	1	8	8	1	1	4	6	1	1	1	1	2	1	1	4	1	6	1	4	2	6	0201/04/06/+	2601/02/03/+		
	3	8	1	8	8	1	1	6	6	1	1	1	1	4	1	1	4	1	8	1	4	4	4	0201/03/04/+	2601/02/03/+		
H1306	4	8	1	8	8	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	1	0201/04/06/+	0201/04/06/+		
	64	8	1	8	8	1	1	6	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	6	1	1	4	1	0201/04/06/+	0201/04/06/+		
	3	8	1	8	8	1	1	8	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	8	1	1	6	1	0201/04/06/+	0201/04/06/+		

*No. 24は陰性コントロール

表3 HLA-B

sample	施設	プローブNo.																																B-1	B-2
		1	2	3	4	5	6	7	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		
H1301	4	8	1	8	1	1	1	1	8	8	1	1	8	1	8	1	1	1	1	1	8	8	1	8	1	1	8	1	1	1	1	8	1503/05/06	2701/02/03/+	
	64	6	1	4	1	1	1	1	8	8	1	1	4	1	4	1	1	1	1	1	4	6	1	8	1	1	4	1	1	1	1	8	1503/06/12	2701/04/08	
	3	8	1	8	1	1	1	1	8	8	1	1	6	1	8	1	1	1	1	1	1	8	8	1	8	1	1	8	1	1	1	1	8	1503/05/06	2701/02/03/+
H1302	4	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	8	1	1	1	1	8	5101/02	5101/02/03		
	64	1	1	1	1	1	6	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	6	1								5101/02/03	(-)		
	3	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	8	1	1	1	1	8	5101/02	5101/02/03		
H1303	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	1	2	1	1	1	8	8	1	1	8	1	1	1	8	3701		
	64	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	8	6	1							3701	(-)		
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	8	1	1	8	1	1	1	1	8	3701	3701	
H1304	4	1	8	1	8	1	1	1	8	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	8	8	8	1	8	8	1	1	1	1	8	0702/04/05	3501/02/03/+		
	64	1	8	1	2	1	1	1	8	8	1	4	1	1	4	1	1	1	1	1	6	6	6	8	1	8	1	1	1	1	8	0702/04/05	3501/07/11		
	3	1	8	1	6	1	1	1	8	8	1	1	6	1	1	8	1	1	1	1	8	8	6	8	1	8	1	1	1	1	8	0702/04/05	3501/02/03/+		
H1305	4	1	1	1	8	1	8	1	1	8	8	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	8	8	1	8	1	1	8	3501/02/03/+	5901		
	64	1	1	1	6	1	8	1	1	8	8	1	4	1	1	1	1	1	1	6	1	1	8	1	8	6	1	6	1	1	8	3501/07	5901		
	3	1	1	1	8	1	8	1	1	8	8	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	8	8	1	8	1	1	8	3501/02/03/+	5901		
H1306	4	1	1	8	1	1	8	1	8	8	1	8	1	1	8	1	1	1	1	8	8	1	8	1	1	1	1	1	1	8	8	1501/12/14/+	4006		
	64	1	1	4	1	1	6	1	8	8	1	2	1	1	4	1	1	1	1	4	2	1	8	1	1	1	1	1	1	6	8	1501/26N/27	4006		
	3	1	1	8	1	1	8	1	8	8	1	8	1	1	8	1	1	1	1	8	4	1	8	1	1	1	1	1	1	4	8	1501/12/14/+	4006		

*No. 32は陰性コントロール

表4 HLA-C

sample	施設	プローブNo.																								C-1	C-2
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
H1301	4	8	1	8	1	1	8	8	6	6	8	1	1	6	8	1	8	1	1	1	8	1	8	1		0403	1202
	3	6	1	4	1	1	6	6	4	4	4	1	1	4	6	1	8	1	1	1	4	1	4	1	0403	1202	
H1302	4	8	1	8	1	8	1	8	8	1	1	8	1	6	8	1	8	6	1	8	1	1	1	8	0704	1502/03/04/+	
	3	8	1	8	1	8	1	8	4	1	1	4	1	4	4	1	8	4	1	6	1	1	1	8	0704	1502/03/04/+	
H1303	4	8	1	1	1	8	1	8	2	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	8	1	1	0602		
	3	4	1	1	1	8	1	8	1	1	8	1	1	4	1	1	8	1	1	4	1	4	1	1	0602	0602	
H1304	4	8	1	8	1	8	1	1	8	1	1	8	2	8	8	8	8	8	1	8	1	1	1	1	0303	0701/02/03/+	
	3	8	1	8	1	8	1	1	8	1	1	8	1	4	6	8	8	8	1	8	1	1	1	1	0303	0701/02/03/+	
H1305	4	8	8	8	1	1	1	1	8	8	1	8	1	8	8	8	8	8	1	8	1	8	1	1	0102/03	0303	
	3	8	8	8	1	1	1	1	8	8	1	8	1	8	8	8	8	8	1	8	1	8	1	1	0102/03	0303	
H1306	4	8	1	8	1	1	8	1	8	1	1	8	1	8	8	8	8	8	1	8	1	1	1	8	0303	0801/03	
	3	8	1	8	1	1	6	1	8	1	1	8	1	8	4	6	8	8	1	4	1	1	1	4	0303	0801/03	

*No. 24は陰性コントロール

表5 シオノギキットによるHLAクラスIタイピング結果

サンプル	HLA-A ローカス		HLA-B ローカス		HLA-C ローカス	
	アレル1	アレル2	アレル1	アレル2	アレル1	アレル2
1301	A*1101/02	A*2402/04 ①A*2402 ②A*2404	B*1503/05/06 ①B*1503 ②B*1503 ③B*1505 ④B*1506 ⑤B*1506	B*2701/02/03/+ B*2701/02/03/05/09 B*2704/06 B*2704/06 B*2701/02/03/05/09 B*2704/06	Cw*0403	Cw1202
1302	A*0201/04/06/+ A*0201/04/06/07/09/10 /15N/16	A*0301	B*5101/02	B*5101/02/03 ①B*5101/02 ②B*5103	Cw*0704	Cw1502/03/04/+ C*1502/03/04/05/06
1303	A*0101/02	A*0101/02	B*3701	B*3701	Cw*0602	Cw0602
1304	A*0201/04/06/+ A*0201/04/06/07/09/10 /15N/16/ /	A*2402/04/07 ①A*2402 ②A*2404 ③A*2407	B*0702/04/05	B*3501/02/03/+ ①B*3501/02/03/04/06/07 /09/12 ②B*3508 ③B*3510/13 ④B*3511	Cw*0303	Cw0701/02/03/+ C*0701/02/03/05/06/08
1305	A*0201/03/04/+ ①A*0203 ②A*0201/04/06/07/09/10 /15N/16	A*2601/02/03/+ A*2601/02/03/04/05	B*3501/02/03/+ ①B*3501/02/03/04/06/07 /09/12 ②B*3510/13	B*5901	Cw*0102/03	Cw0303
1306	A*0201/04/06/+ A*0201/04/06/07/09/10 /15N/16	A*0201/04/06/+ ①A*0201/04/06/07/09/10 /15N/16 ②A*0214/17	B*1501/12/14/+ ①B*1501/26N/27 ②B*1512/14/19	B*4006	Cw*0303	Cw0801/03

PCR-RFLPの解析

鳥谷竜哉, 竹内潤子, 奥山正明

愛媛県立衛生環境研究所, 疫学情報科

1. はじめに

PCR-RFLP法は、グループ特異的PCRで増幅した産物を制限酵素で切断し、その切断片の大きさを電気泳動によって解析する方法である。本法を用いたキットは2社から発売されているが、alleleの多型部位を認識する制限酵素があれば、制限酵素を追加するだけで新規のalleleを解析できる利点もあり、キットに頼らず自家製で実施している施設も多い。

2. 参加施設・方法

RFLP法を実施した施設数は、DRB1で64施設中16施設 (25%)、DQB1で39施設中15施設 (38%)、DPB1で15施設中13施設 (87%)であった。クラスIIタイピング用のキットはSMI-TESTとDRLabの2種類があるが、自家製でタイピングを行う施設も多く、DRB1ではRFLP法を使用した施設の半数、DQB1、DPB1では7割以上の施設であった。また、3施設がクラスIのタイピングに自家製のRFLP法を使用していた (表1)。

表1 PCR-RFLP法の使用施設数

locus	参加施設	RFLP使用施設		キット別使用施設数		
		施設数	利用率	自家製	SMITEST	DRLab
DRB1	64	16	25%	8	6	2
DQB1	39	15	38%	12	1	2
DPB1	15	13	87%	9	2	2
A,B,C	53	3	6%	3	-*	-*

3. 結果

#1302のDRB1*1104,*1201を*1101,*1201と判定した施設が1施設、#1305のDQB1*0302,*0401を*0302,*0402と判定した施設が1施設、#1306のDPB1*0201,*二を*0201,*0901と判定した施設が1

施設あった。

クラスIIの各ローカス別に、RFLP法を使用した施設と使用しない施設の一致率を比較した (表2)。RFLP法を使用した施設ではDRB1のhigh resolutionレベルで1施設に不一致の回答があった。一方、RFLP法を使用していない施設では、7施設で#1303のDRB1*16011,*が不正解だったため、RFLP法を使用した施設は、使用していない施設よりも高い一致率(98.3%)を示した。RFLP法ではDRB1*15,*16 (DR2) を一つのグループとして増幅し、DRB1*1501/03以外はグループ内のヘテロの組み合わせも4桁でタイピングできるため、他法を用いた施設よりも良好な結果が得られたと考えられる。

4. 問題点及び対処方法

1) DRB1

太田らのmodified PCR-RFLP法 (1) や、不一致例の報告施設が使用していたSMI-TESTでは、DR3,5,6,8 (DR52関連抗原) を一つのグループとして増幅する。#1302で問題となったDRB1*1101と*1104とは制限酵素Hph Iの109bpと120bpとの違いで区別できるが、今回のサンプルではDRB1*1201が持つ110bp、120bpのバンドと重なるためheterozygoteの区別が出来ない (表3)。この対策として、Cfr13 I + Hph I やRsa I + Hph I のように2種類の制限酵素で同時に処理 (double digestion) してDRB1*1101の109bp、*1104の120bpのバンドを2つのフラグメントに分けることで、DRB1*1201の120bpと区別できるようになる (表3)。

modified PCR-RFLP法が発表された当時、DR3,5,6,8グループで解析の対象としたallele数は22に過ぎなかったが、2001年4月現在では204と10

倍近くまで増加し、RFLPパターンは年々複雑化している。我々はDR3,5,6,8グループの解析を容易にするため、センス、アンチセンスそれぞれ2種類のプライマー(表4)を組み合わせて、DR8, DR12, DR52V, DR52Gの4グループに分けるPCRを行っている(表5)。この方法では、Hph Iの認識部位であるコドン86のバリンとグリシンの多型を、2種類のアンチセンスプライマーで別グループとして増幅

するため、前述のdouble digestionが不要となり誤判定の防止にも有効と考えている。

2) DQA1

DQA1は自家製のPCR-RFLP法で結果を報告している施設が多いと考えられる。今回のQCWSではDQA1*0505が#1302, #1305, #1306の3検体に含まれていたが、回答した13施設中2施設が3検体

表2 PCR-RFLP法使用施設の一一致率

locus	参加施設全体			RFLPを使用した施設			RFLPを使用しない施設		
	回答数	一致数	一致率	回答数	一致数	一致率	回答数	一致数	一致率
DRB1 (low resolution)	64	59	92.2%	16	16	100%	48	43	89.6%
DRB1 (middle, high resolution)	47	38	80.9%	16	15	93.8%	31	23	74.2%
DQB1 (middle, high resolution)	39	36	92.3%	15	14	93.3%	24	22	91.7%
DPB1 (middle, high resolution)	15	14	93.3%	13	12	92.3%	2	2	100%

表3 DR3,5,6,8グループのRFLPパターン

allele	Hph I						Cfr13 I +Hph I						Rsa I +Hph I											
	145	120	110	109	35	11*	145	120	110	64	56	53	35	11*	120	110	101	90	81	50	21	19	14	11*
1101																								
1104																								
1201																								
1101,1201																								
1104,1201																								

表4 プライマーの塩基配列

primer*	sequence
DR8,12 (P273)	TTCTTGGAGTACTCTACGGG
DR3,5,6 (P68)	GTTTCTTGGAGTACTCTACGTC
3'R86V (P37)	CTGCACTGTGAAGCTCTCAC
3'R86G (P38)	CTGCACTGTGAAGCTCTCCA

* Bunceら(2)のプライマーによる。

すべてをDQA1*0501/02あるいは*0501/03と報告していた。通常行われているPCR-RFLP法はexon2を解析の対象としているため、前回のQCWSでも指摘されているとおりexon1あるいはexon3に多型を有するDQA1*0501, *0503及び*0505は区別できないことを理解し、必要に応じてDQA1*0501/03/05のように表記を改めるべきである。

5. まとめ

表5 DR8, DR12, DR52V, DR52GグループのPCR

PCR group	sense primer	antisense primer	標準で使用する制限酵素	日本人に見いだされるallele
DR8	DR8,12	3'R86V	Fok I, Hae II, Sac II, Ava II, SfaN I, Rsa I	0802,08032,0809
DR12	DR8,12	3'R86G	Fok I, Pst I, Mbo II, Rsa I, Alu I	12011,12021
DR52V	DR3,5,6	3'R86V	Fok I, Hae II, Sac II, Ava II, SfaN I, Rsa I	0302,1101,13021,1307,1402,1403,1407
DR52G	DR3,5,6	3'R86G	Ava II, Pst I, Sac II, SfaN I, Rsa I	0301,1102,1103,1104,1301,1304,1401,1405,1406

- 1) PCR-RFLP法はクラスIIタイピングを行った施設の1/4以上が使用しており, そのうちの半分以上は自家製であった。
- 2) PCR-RFLP法を使用した施設の不一致例はDRB1, DQB1, DPB1でそれぞれ1例ずつあった。
- 3) DRB1の不一致例はdouble digestionの追加や, グループ特異的PCRを細分化することで対応可能と考えられる。
- 4) 自家製で結果を報告する場合には常に検査方法の限界を把握し, 定期的にデータのアップデートを行う必要がある。特にDQA1において, exon2のみを解析の対象としている場合は表記方法に注意が必要である。

文 献

1. Ota M, Seki T, Fukushima H, *et al.* : HLA- DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* **39** : 187-202, 1992.
2. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, *et al.* : Phototyping : comprehensive DNA typing for HLA - A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence - specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* **46** : 355-367, 1995.

3. 方法別報告Ⅱ

ABI SBT HLA-B キットの評価

小野明子, 石井博之, 池田通代

大阪府赤十字血液センター, 技術部

1. はじめに

HLA 対立遺伝子の塩基配列多型を直接検出する検査法として, Sequencing Based Typing (SBT) 法がある。今回 (第5回) のQC ワークショップ参加施設64施設のうち, クラス I タイピングにおいて SBT法を導入した施設は, 10施設であった。

我々は, クラス I B Locus タイピングにおいて, Applied Biosystems 社の SBT 試薬 HLA-B タイピングキットを使用した, これまでにこのキットを用いて検査を行った今回の配布サンプル6例, および別にタイピングを行った20例の計26例についての結果を述べる。

2. SBT法の活用例

我々が SBT を行う場合の活用例について, 以下に列記する。

1. 血清学での判定不能例
2. 他法の結果との確認
3. 他法での判定不能例
4. 稀な遺伝子型の確認
5. New allele を疑う場合
6. 高精度タイピング法として使用

3. 結果

今回の QC ワークショップのサンプル6例 (H1301~H1306) において, コンセンサスタイプとの不一致例は見られなかった。Applied Biosystems 社の SBT 試薬 HLA-B タイピングキットを使用した26例について, 他法 (PEL-FREEZ SSP UNITRAY, シオノギ HLA-B, B の RFLP 法) とのタ

イピング結果を比較した (表1)。26例中 SBT 法でタイピング結果の得られなかったものは, No.21 B9230 の1例だけであった。波形結果の不明瞭な部分もあり, 再検査を行ったが同様の結果となり, タイプの決定は得られなかった。

4. 考察

SBT 法が導入され始めた当初は, 超高精度タイピング法として活用が期待されていた。塩基配列を直接検出可能なことから, サンプルの泳動を行えば, 瞬時に結果が得られると思われがちである。実際には, 泳動までの操作方法自体は簡便であるが, 判定の際, 解析ソフトを使用してもシーケンス情報を目視で確認するため, 結果を得るまでに時間を要する検査法である。ヘテロ接合時の一部において, 波形の不明瞭さも解析に時間を要してしまう原因となる。そして, すべての対立遺伝子の決定が行える訳でもなく, 遺伝子数が日々増大していく現在では, 決定できないヘテロ接合体の組み合わせも少なくない。

これらの問題点を考慮しながらも, 高精度なタイピング結果を必要とした際に, 活用していけば, 非常に有効な検査法であると考えられる。

5. まとめ

我々の感じた SBT 法での長所と短所を以下に列記する。

長所

1. 操作方法が簡便である。
2. ホモ, ヘテロ接合体の確定が可能。

3. Exon 2,3,4と増幅領域が長い為、遺伝子型の決定に有効。
4. 4種の蛍光を認識できるため、1検体を1レーンで識別することが可能。
5. 遺伝子型判定ソフト(Match Tools / MT Navigator)を使用するため、従来に比べ、判定が容易になった。

短所

1. タイピングコストが高価である。
2. 判定の際、ヘテロ接合時の一部において波形結果が不明瞭なものもあり、判定に時間を要する。

表 1 ABI SBT HLA-B キット実施検体の他法との比較 (N=26)

No.	Serology	PEL-FREEZ SSP UNITRAY	シオノギ HLA-B	B-RFLP		SBT(ABI HLA-B kit)	
1	H1301	NT	*15,*27	*15,*27	*1506,*2704		*1506,*2704
2	H1302	NT	*51	*5101/02,- *5101/02,*5103	*51011/021/03/09		*51011
3	H1303	NT	*37	*3701	*3701		*3701
4	H1304	NT	*07,*35	*07,*35	*0702,*3501 *0702,*3511	*0702,*3503	*07021,*35011 *0718,*3505 *0709,*3534※ *0724,*3515※
5	H1305	NT	*35,*5901	*35,*5901	*3501,*5901 *3511,*5901	*3503,*5901	*35011,*5901
6	H1306	NT	*15,*40	*15,*4006	*1501,*4006 *1514,*4006	*1512,*4006 *1519,*4006	*1501101,*4006 *1504,*4011※ *1501102N,*4006
7	4-1	NT	*40,*4601	*4002/03,*4601	*4002,*4601		*4002,*4601
8	4-2	NT	*35,*5401	*35,*5401	*3501,*5401 *3511,*5401	*3503,*5401 *3521,*5401	*3501,*5401
9	4-3	NT	*07,*40	*07,*4001	*0702,*40011	*0702,*40012	*07021,*40011 *07021,*40012
10	4-4	NT	判定不能	*4002/03,*4601	*4002,*4601		*4002,*4601
11	4-5	NT	*07,*40	*07,*4002/03	*0702,*4002		*07021,*4002 *0706,*4018※ *0705,*4018※
12	5-1	NT	*46,*71	*1509/10/18, *4601	*1518,*4601		*1518,*4601
13	5-2	NT	*39,*55	*3901/04/05/07, *5502	*39011/013/05,*5501/02/03/05		*39011,*5502 *39013,*5502
14	5-3	NT	*52,*5401	*5201,*5401	*52011,*5401		*52011,*5401
15	5-4	NT	*44,*5401	*4403,*5401	*44031,*5401		*44031,*5401
16	5-5	NT	*44,*52	*4403,*5201	*44031,*52011		*44031,*52011
17	367498	35,62	*15,*35	*15,*3505	*1535,*3505 *1535,*3517		*1535,*3505※
18	B3690	62,-	NT	*15	*1501/12/14/19		*15011
19	931246	8,39	NT	*08,*3910	*0801,*3910		*0801,*3910
20	364405	13,56	NT	*1301,*5601	*1301,*5601		*1301,*5601
21	B9230	62,5103?	NT	NT	判定不能		*15011,*5103 ?
22	250011	7,4007 ?	NT	NT	*0702		*07021
23	367418	8,39	NT	NT	*0801,*3906 *0801,*3909		*0801,*39062
24	364377	52,62	NT	NT	*1526N,*52011 *1527,*52011	*1532,*52011	*1527,*52011※
25	367312	18,61	NT	NT	*1801,*4006 *1805,*4006	*1803,*4006	*1801,*4006
26	367471	35,39	NT	NT	*3501,*3909 *3511,*3909	*3503,*3909	*3501,*3909

NT : Not Test

※ : No Exon4

自家製プライマーによるHLAクラスI - SBT (Sequence based typing)

橋本 光男

兵庫県立西宮病院, 腎移植センター

1. はじめに

現在, 我々の施設で実施しているHLAクラスIタイピングは, 第一段階としてPCR-SSOP法を用いてLow resolutionレベルでのタイピングを行ない幾つかの塩基配列に特徴的なグループに分ける。そして, HLA-Cを除いたHLA-A, -Bについては第二段階として各グループ毎に特異的なプライマーを用いてPCR増幅を行い, 自家製PCR-SSOP法或いはPCR-SBT法によるHigh resolution レベルでの遺伝子型タイピングを行っている。

この方法は検査の結果が出るまでには長時間を要するが, 遺伝子型の組み合わせによるambiguity等の問題を考慮する必要がなく, また再現性という面でも有効な方法と考えられるので日常業務に取り入れている。

前回のQC-ワークショップからこの方法を用いてHLAクラスIタイピングに参加しているが, 今回のワークショップのDNAサンプルで生じた我々の方法の問題点を簡単に紹介する。

2. 当施設のPCR-SBT法

HLA-A, -B, -Cタイピングの基本的なプライマーを図1に示す。これらのプライマーは, Cereb等が考案したエクソン2及びエクソン3を増幅する各ローカスに特異的なイントロンプライマーで, 同一条件でPCRを行うことが出来る(1)。シーケンス反応のうちエクソン2のシーケンスはそれぞれの5'プライマー, エクソン3シーケンスは3'プライマーをシーケンスプライマーとして用いBigDye Terminator法によるサイクルシーケンスを行った。反応終了後, 余剰のDye Terminatorをスピнкаラム法で除去してからABI PRISM 377 DNA Sequencerで約6時間泳動した。シーケンス結果は自動解析されるが, ヘテロ接合体を検出するためにはシーケンス反応のピークを目視で修正する必要がある。このステップが本法において最もミスタイプの原因となるので, 時間をかけて慎重にチェックする必要がある。今回のワークショップでミスタイプの結果を報告したのは, このステップでのピークの見落としが原因となっている。シーケンスデータの再解析後, DNASISソフトウェア(日立ソフトウェアエンジニアリング)を用いて既に報告されている遺伝子型とのホモロジー検索を行い, 遺伝子型を決定する。

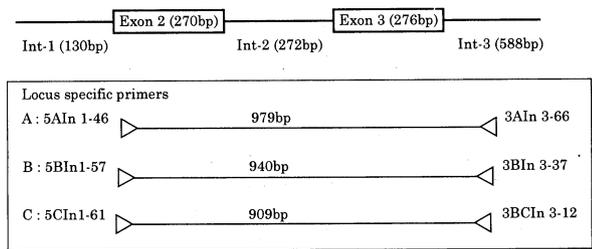


図1 HLAクラスIタイピング用プライマー

3. サンプルH1302のHLA-Cタイピングの結果

サンプルH1302のHLA-CのコンセンサスタイプはC*0704, *1502であるが, 我々は上記の方法でC*0704, *1503と報告した。C*1502と*1503はエクソン2のコドン72のGAC(Asp)がGGC(Gly)である以外はエクソン3も含め同じ配列で, 僅か1塩基のみが置換している遺伝子型である。サンプル

H1302のシーケンス反応を図2に示したが、284番目のピークがR(G/A)のヘテロであるにもかかわらず(A)のピークを見落としていた。従って、エクソン2のコドン72の配列はGGGとなり、ホモロジー検索でC*0704と1503が一致率100%になったのである。エクソン3のC1502と*1503は同じ配列であるので両者の区別ができないことも確認を怠る要因の一つになったのである。

4. まとめ

HLAの遺伝子型の塩基配列を直接にシーケンスしてタイピングを行うSBT法は、新しい蛍光ラベル色素であるBigDyeが開発されたことにより、ヘテロ接合におけるピークの均一性とバックグラウンドノイズが低くなり、容易にヘテロのタイピングが可能となった。しかし、ヘテロの塩基の組み合わせ等によりピークの高さが均一にならないケースに遭遇することがある。従って、シーケンス反応におけるヘテロのピークの有無を目視で詳細にチェックしな

ければならず、SBT法における唯一改良の余地のあるステップと考えられる。今回のワークショップの経験を踏まえ、我々が実施しているSBT法についてもさらに検討していきたいと考えている。

文 献

1. Cereb.N, *Tissue Antigens* 45;1-11,1995.

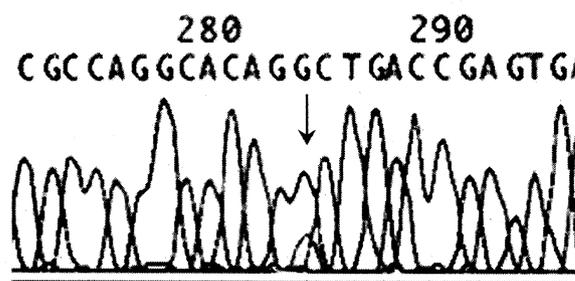


図2 sample #1302のHLA-C exon2 forward sequencing

Sequencing Based Typing (SBT)法の評価とまとめ

成瀬妙子¹⁾, 柏瀬貢^{—2)}

¹⁾東海大学医学部分子生命科学系, ²⁾東京都赤十字血液センター

1. はじめに

Sequencing Based Typing (SBT)法は、究極のHLAタイピング法として、高精度タイピング法の中で最も信頼されている方法である。それは、本法が多型部分の塩基配列を直接認識するという、他法とまったく異なる特色を持つことによる。1994年にHLA-DP遺伝子のタイピングに初めて導入されて以来、改良、検討が重ねられ、現在ではすべてのHLA遺伝子座について応用されており、専用の試薬キットや遺伝子型判定ソフトも充実しつつある。

今回のワークショップでは、クラスI, クラスII合わせて12施設がSBT法を用いており、前回よりの大幅な参加施設増は、本法の急速な普及を物語っている。

今回、様々な施設から、複数のSBTプロトコールにより行われた結果が得られたことから、本ワークショップではじめて本格的なSBT法の評価を行うことが可能となった。そこで本稿ではSBT法の、HLAタイピング法としての役割を再認識するという目的で、タイピング結果の解析を行い、問題点の

整理を行った。

2. 参加施設・方法

参加施設および使用された方法について表1にまとめた。参加施設の内訳は表1の通りであるが、血液センターが最も多い。これはやはり骨髄移植のための確実な高精度タイピングが要求されることによるものと思われる。目的遺伝子としては、クラスIでは全施設が使用していた。特に他法での高精度タイピングが簡便ではないB遺伝子での使用が多かった。クラスIIにおいては主にDR遺伝子に用いられていた。

方法については、既製の試薬キットや解析ソフトを使用する場合と自家製の場合とに大別されるが、大半は判定ソフトが附随している既製のキットを使用していた。今回は、キットやソフトごとの解析を行うには回答数が不十分であることから、解析の際の分類は行わなかった。結果解析にあたってはデータの正確性を増すため、聞き取り調査などによりSBT法を用いた回答のみを採用した。さらに、問題点を明確にするため、回答に不一致のみられた部分のみ解析をおこなった。また、DQ遺伝子については回答が1施設であり、DP遺伝子では2施設の結果が一致していたことから、対象から除外した。

3. 判定結果

判定にSBT法を用いている施設では、用いていない施設と比べて概ね高精度で詳細なタイピング結果が得られており、SBTの実力が発揮されていた。4桁でのアレルの特定や5桁以上のタイピングもほとんどの施設でassignが可能になっていた。特にクラスI遺伝子では、本法を用いていない群と比較してほとんどの施設で4桁でのアレルの特定が的確に行えており、回答の一致率も高かった。しかしながら、高精度タイピング故に起こしやすい間違いや、SBT法についての認識不足、経験不足から生じるミス、表記上の問題点なども見受けられた。以下にその例と対策案を示す。

4. 問題点

1) Null alleleなどとの識別と表記について

表1 参加施設・方法

1. 参加施設数	1 2 施設
内訳	
血液センター	5
大学, 研究所	3
企業	2
検査センター	1
病院検査室	1
2. SBT法を解析に用いた遺伝子座	
クラスI	
A,B,C遺伝子	5
A,B遺伝子	6
B遺伝子のみ	1
クラスII	
DR,DQ,DP遺伝子	1
DR,DP遺伝子	2
DR遺伝子のみ	6
3. SBT法の用途	
クラスI, クラスII共に主方法として	5
クラスIのみ主方法として	1
クラスI, クラスII共に第二方法として	3
クラスIのみ第二方法として	3
クラスIIのみ第二方法として	1
4. 解析に使用した試薬について	
クラスI	
アプライドバイオシステムズ社(ABI)製	8
ビジブルジェネティクス社(VGI)製	2
フォレンジックアナリティカル社(FA)製	1
自家製	3
クラスII	
アプライドバイオシステムズ社(ABI)製	6
ビジブルジェネティクス社(VGI)製	2
フォレンジックアナリティカル社(FA)製	1
自家製	2

(B*1501101, A*2402101他)(表2, 3)

WHO命名委員会では、対立遺伝子(アレル)番号の末尾にNがついている場合はnull allele (塩基配列に置換, 欠失, 挿入が起こったためにタン

パク分子としての発現が認められない), Lが付加される場合にはlow expression (同上の理由で発現量が減少している)として通常の対立遺伝子と区別している。今回の回答に含まれているB*1501,A*2402などの場合, 市販のクラスI SBTキットを使用した場合には, 第2から第4エキソンをカバーする形でPCRプライマーが設計されているが, B*1501102Nは第1イントロンに欠失, A*2402102Lは第2イントロンに置換が, いずれも認められるため, B*1501101, とB*1501102N, A*2402101とA*2402102Lを識別するには注意が必要である。

すなわち, イントロン部のシークエンスデータを利用した場合や, この部分について他法での確認を行い, 識別できた時のみB*1501101, A*2402101などの表記が可能となる。識別を行

っていない場合, 表記としてはB*1501101or B*1501102N, A*2402101or A*2402102Lとなるが, 昨年の本学会標準化委員会で提唱された表記法(1)に従うと, 5桁以上でアリルの特定ができない場合は4桁表記までとなるので, B*1501, A*2402が正しい表記となる。表2に示したように, B*1501についての各施設での回答を例にとると, 3通りの回答がみられたが, 現在のところB*15011という名称は, 命名委員会では用いられていないので(公認されているのはB*1501101, B*1501102Nのみ), 御留意頂きたい。同様にA*2402についても表3のように4種の回答がみられるが, A*24021という名称は公認されていない。

2) SBT法のみでは識別不能なアリルの存在

特にDRB1遺伝子の場合, PCR増幅にグループ特異的プライマーを用いて増幅されたPCR産物をシークエンス反応の鋳型とすることが多い。現在, ほとんどの市販キットが, DRB1遺伝子の第2エキソン第1超可変部にPCRの5'側プライマーを設定し, シークエンスの対象を第2エキソンのみに絞っている。そのため, 第2エキソン以外に多型が認められるアリルや, 第2エキソン内でもPCR増幅領域に含まれない部分に多型が存在するアリルの識別は, SBT法のみでは不可能である。例えば, DRB1*1201とDRB1*1206の第2エキソンの塩基配列は同一である。両者を識別可能な第1, 第3エキソンの多型部分のタイピングを行っていない場合には, 回答はDRB1*1201/06と表記されなければならない。

また, DRB1*11011についても, 第2エキソンにてDRB1*1105(コドン13), DRB1*1130(コドン10)との識別を行わなくてはならないが, ABI社キットではシークエンス用プライマーがそれらより下流に設定されており, 3者の区別は不可能である。ただし, DRB1*1130は多型部分にPCRプライマー設定されていると考えられ, PCRで増幅されない可能性も残る。VGI社キットの場合もDRB1*11011とDRB1*1130の識別は不能であるが, 実際には他法による確認を行わずにDRB1*11011(1101)と表記している施設がみら

表2 B*1501についての回答例

施設	H13#6-B-1	H13#6-B-2
A	4006	1501
B	4006	1501
C		
D	1501	4006
E	15011	4006
F	15011	4006
G	*15011 or *1504	*4006 or *4011
H	*1501,4006	*1504,*4011
I	1501101	4006
J	*1501	*4006
K	1501	4006
L	4006	1501101

表3 A*2402についての各施設の回答例

施設	H131-A-1	H13#1-A-2
A		
B	2402	1101
C	*11011	*24021/09N/11N
D	1101	2402
E	1101	
F	1101	24021
G	*11011	*24021
H	*11011	*2402
I	11011	2402101
G	*1101	*2402
K	11011	2402101
L	11011	2402101

れた。

このように、自分がタイピングしようとする領域や識別の際問題となる塩基配列について、用いるキットや方法の情報を十分承知しておく必要がある。

3) 目読解析の誤判定

自家製プライマーを使用した場合や、解析ソフトでの編集が困難な塩基配列データなど、シーケンス結果を目読で判定する場合、とくにヘテロ接合体の解析には注意が必要である。H1302のC遺伝子はCw*0704,15021であるが、目読で不均一な波形を見落とししたため、Cw*0704, 1503となってしまった例がみられた。目読の場合、不均一な重なり波形はForward, Reverse両方の結果を照合して確認することが望ましい。

4) 塩基配列情報が活用されていない

H1303のDRB1遺伝子は、DRB1*16011のホモ接合体である。クラスII参加の8施設中7施設までが5桁での特定が可能であったが、1施設の回答がDRB1*16011,16021のヘテロ接合体となっていた。原因は、SBT法にてDRB1*16011ホモ接合体と特定したものの、従来使用していたSSP(sequence specific primer)法での結果を採用したとのことであった。両者はコドン67番のTTC (16011)とCTC (16021)で識別可能であり、塩基配列データで波形の確認を行えば容易に判定可能と思われる。塩基配列の違いを直接検出するという、SBTの最大の利点が活かされていなかった。

5) SBTは高精度タイピング法である

SBT法は、器機や試薬が比較的高価であることから、主方法として用いた場合には、コスト高となる。そこで他法でのタイピングが困難な場合や、確認用に第二法として用いている施設も多い。こうした場合にはすでに血清学レベルである程度の情報が得られていることが多く、SBTにより迅速なアレルの4桁の特定が可能な場合がほとんどである。今回、SBTを用いて2桁での回答が見受けられたが、せっかく高価で高精度なタイピングを行ったのであるから、結果は4

桁以上でassignするようになりたいものである。

5.まとめ

さらに高度なタイピングを目指すために、今回は問題点を中心に述べた。しかしながら、SBT法は、現時点では最も信頼性の高い方法である。本法をさらに活用するためには、使用者が以下のような特性をよく理解することが重要と思われる。

1) SBT法は100%のタイピング法ではない

シーケンシングに使用する自動蛍光シーケンサーの精度は通常、98.5%といわれており、従って再試行が必要な場合もある。また、識別不可能な対立遺伝子やヘテロ接合体の組み合わせが存在する。

2) データ解析こそが重要

シーケンサーでの電気泳動終了時に、瞬時にアレルが特定できると考えている人が意外に多いが、SBTの操作は、解析部分が最も重要である。従って、波形の重なりや高さなどの塩基配列情報をどのように編集し、活用するかが結果の信頼性に影響する。今回も塩基配列データで正しいデータが得られているにもかかわらず、判定や表記にそれが活かされていない例が目立った。こうしたミスを防ぐためには、使用者がそれぞれの試薬やプロトコール、解析ソフトなどについてそれらの特性と問題点を把握していることが肝要である。

以上のようなまとめを参考に、次回ワークショップではさらに多くの参加を期待するところである。

参考文献

1. 日本組織適合性学会HLA標準化委員会：アレル表記法と結果報告の原則について2000, *MHC* 7:131-132, 2000.