

MHC

Major Histocompatibility Complex

日本組織適合性学会誌 第9巻第1号 平成14年4月30日発行

Contents

第11回日本組織適合性学会大会のご案内 (II)	1
平成14年度 認定HLA検査技術者特例認定実施要領	6
平成14年度 認定組織適合性指導者資格特例認定実施要領	7
[原著論文] Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I Expression in Polymorphonuclear Leukocytes by Triggering CD16 Antigen: Different Effects of Two Clones of anti-Fc γ RIII Monoclonal Antibody Motoko Nishimura, Yoshihide Ishikawa, Shigeki Mitsunaga	8
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 他 16
クラスIタイピングの評価	斉藤 敏 他 19
クラスIIタイピングの評価	橋本光男 他 23
Ambiguityの記載方法の原則について	木村彰方 他 29
2. 方法別報告 I	
DYNAL-SSPの評価	樋口 香織 30
Micro-SSPの評価(解析)	男山 順子 34
ユニトレイの評価	野田 岳 他 36
Dynal RELI(A,B,DRB,DQB)の評価	橋口裕樹 他 39
INNO-LiPAの評価	中島 文明 42
PCR-MPH の評価	大熊 重則 46
シオノギHLA-DNAタイピングキットの評価	山岡 学 他 49
PCR-RFLPの解析	鳥谷 竜哉 他 52
3. 方法別報告 II	
ABI SBT HLA-B キットの評価	小野明子 他 55
自家製プライマーによるHLAクラスI-SBT	橋本 光男 57
Sequencing Based Typing (SBT)法の評価とまとめ	成瀬妙子 他 58
日本組織適合性学会 会告	62
訂正	66
Osaka Kidney Transplantation Forum 2002	67
<日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定>	68
編集後記	70

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

J S H I

平成14年度認定 HLA 検査技術者特例認定申請書

認定HLA検査技術者特例認定の申請をいたします。

※申請番号

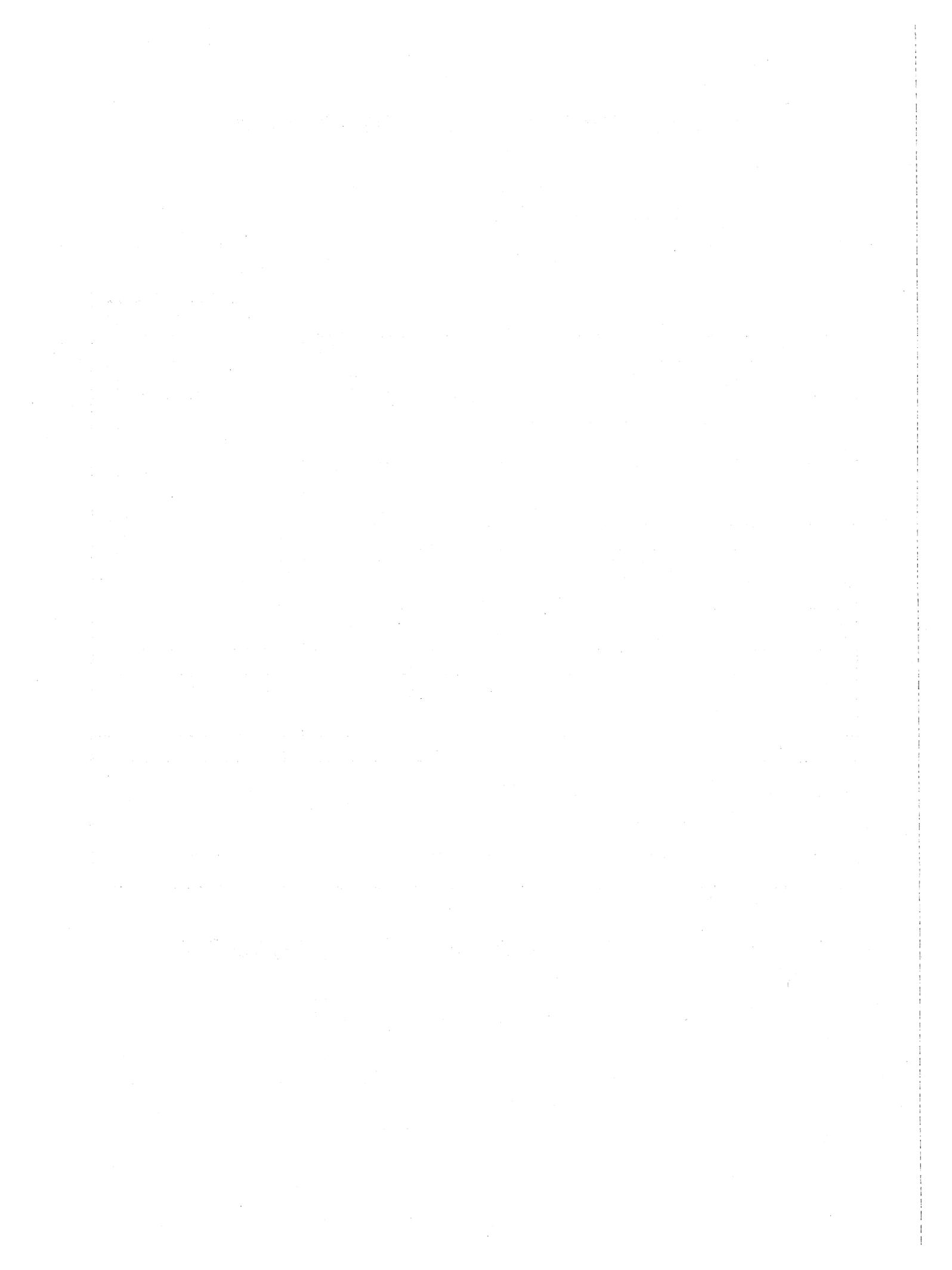
平成 年 月 日申請

フリガナ		性別	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: auto;"> <p>写真を貼付</p> <p>申請日前6カ月以内に撮影されたもので大きさは4×3 cm</p> <p>平成 年 月 日撮影</p> </div>	
申請者氏名	(印)	男・女		
生年月日	(歳)			
本籍地 (都道府県名)				
フリガナ				
現住所				
電話	()			
フリガナ				
勤務先名				
フリガナ				
勤務先住所				
電話	()	ファックス	()	
電子メール	@			

注 太枠内の必要事項を楷書で記入すること。※欄は記入しないこと。

※受付日	※書類の不備	※認定証番号・発行日
------	--------	------------

切り取り線



平成14年度認定組織適合性指導者特例認定申請書

認定HLA検査技術者特例認定の申請をいたします。

※申請番号

平成 年 月 日申請

フリガナ		性別	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: auto;"> <p>写真を貼付</p> <p>申請日前6カ月以内に撮影されたもので大きさは4×3 cm</p> <p>平成 年 月 日撮影</p> </div>	
申請者氏名	(印)	男・女		
生年月日	(歳)			
本籍地 (都道府県名)				
フリガナ				
現住所				
電話	()			
フリガナ				
勤務先名				
フリガナ				
勤務先住所				
電話	()	ファックス	()	
電子メール	@			

注 太枠内の必要事項を楷書で記入すること。※欄は記入しないこと。

※受付日

※書類の不備

※認定証番号・発行日

切り取り線

[The page contains extremely faint and illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document. The text is too light to transcribe accurately.]

資格審査基準証明書

申請日：平成 年 月 日

申請者名			
生年月日	昭和	年	月 日
勤務先			
勤務先住所			
電話番号			
1	日本組織適合性学会会員歴	年 月加入	申請日までの会員歴通算 年
2	QCワークショップ参加歴		申請日までの参加歴通算 年
3	組織適合性関連業務歴 (内訳)		申請日までの業務歴通算 年
4	講習会参加歴	平成 年 月参加	
5	総取得単位数		単位
(内訳)	原著論文		単位
	著書		単位
	学会発表		単位
	学会参加		単位
	講習会		単位
	QCワークショップ集会参加		単位
	実技研修会		単位
以上、相違ないことを証明します。			
平成 年 月 日			
			申請者名 ㊟
			所属長名 ㊟
			(職名)

切り取り線

単位内訳書 (原著論文・総説)

申請者名

(別記様式第2の2)

番号	著者名	題名	発表雑誌名	巻	ページ	発行年

切り取り線

単位内訳書 (著書・総説)

申請者名

(別記様式第2の3)

番号	著者名	題名	本名	出版社名	ページ	発行年

切り取り線

単位内訳書 (学会発表)

申請者名

(別記様式第2の4)

番号	発表者名	題名	学会名	開催地	抄録	巻	ページ	発行年

切り取り線

貼 付 用 台 紙

(この用紙に学会参加証及び講習会参加証の写しを貼付してください。)

A large, empty rectangular box with a solid black border, intended for pasting copies of conference and workshop participation certificates.

切り取り線



Contents

第11回日本組織適合性学会大会のご案内(Ⅱ)	1
平成14年度 認定HLA検査技術者特例認定実施要領	6
平成14年度 認定組織適合性指導者資格特例認定実施要領	7
〔原著論文〕 Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I Expression in Polymorphonuclear Leukocytes by Triggering CD16 Antigen: Different Effects of Two Clones of anti-Fc γ RIII Monoclonal Antibody Motoko Nishimura, Yoshihide Ishikawa, Shigeki Mitsunaga	8
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 他	16
クラスIタイピングの評価.....齊藤 敏 他	19
クラスIIタイピングの評価.....橋本光男 他	23
Ambiguityの記載方法の原則について.....木村彰方 他	29
2. 方法別報告Ⅰ	
DYNAL-SSPの評価.....樋口 香織	30
Micro-SSPの評価(解析).....男山 順子	34
ユニットレイの評価.....野田 岳、酒巻建夫	36
Dynal RELI(A,B,DRB,DQB)の評価.....橋口裕樹 他	39
INNO-LiPAの評価.....中島 文明	42
PCR-MPHの評価.....大熊 重則	46
シオノギHLA-DNAタイピングキットの評価.....山岡 学 他	49
PCR-RFLPの解析.....烏谷 竜哉 他	52
3. 方法別報告Ⅱ	
ABI SBT HLA-Bキットの評価.....小野明子 他	55
自家製プライマーによるHLAクラスI-SBT.....橋本 光男	57
Sequencing Based Typing (SBT)法の評価とまとめ.....成瀬妙子 他	58
日本組織適合性学会 会告.....	62
訂正.....	66
Osaka Kidney Transplantation Forum 2002.....	67
<日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定>	68
編集後記	70

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

JSHI

第11回日本組織適合性学会大会のご案内（II）

第11回日本組織適合性学会大会

大会長 前田 平生

皆様には益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

第11回日本組織適合性学会大会を下記の要領で開催致します。本大会のメインテーマは、「移植・細胞治療におけるHLAの意義・役割」であります。そこで、下記の学術プログラムを企画致しました。多くの皆様のご参加をお待ち致しております。

会 期：大会 2002年9月24日（火）～25日（水）

尚、HLA DNAタイピングのQCワークショップおよび認定講習会は、前日の9月23日（月：祝日）に同所で行います。

会 場：川越プリンスホテル プリンズホール

〒350-8501

埼玉県川越市新富町1-22

TEL：049-227-1111 FAX：049-227-1110

HP：川越市 www.city.kawagoe.saitama.jp/

川越プリンスホテル www.princehotels.co.jp/kawagoe/

交 通：

1) JR 埼京線・川越線（恵比寿－新宿－大宮－川越駅間）

新宿－川越 約51分（通勤快速）

池袋－川越 約45分（通勤快速）

大宮－川越 約18分

JR東日本時刻表 www2.jreast.co.jp/estation/station_time/index.asp

2) 東武東上線（池袋－川越市駅間、営団地下鉄有楽町線が乗り入れ）

池袋－川越 30分（急行・特急）

和光市－川越 17分（急行）

有楽町－和光市 38分

東武鉄道時刻表 www.tobu.co.jp/train/time/index.html

3) 西武新宿線（西武新宿－本川越駅間）

西武新宿－本川越	43分(特急小江戸号)
西武新宿－本川越	45～57分(急行等)
所沢－本川越	21分

西武鉄道時刻表 www.seibu-group.co.jp/timemenu/index.html

駅から会場まで：

川越プリンスホテルの1階が西武新宿線本川越駅

JR線、東武東上線の川越駅から徒歩10分

(御注意) 川越駅 (JR線、東武線) および川越市駅 (東武線) は、会場のある本川越駅とは約600mほど離れています (鉄道では直結していません)

自家用車：

関越自動車道練馬IC－川越IC間約20km

川越ICから3km (非混雑時10分)

ホテル有料駐車場330台 (お願い：休日は公共交通を御利用ください)

I. 大会内容

今回は以下のような学術プログラムを予定しています。

1. 特別講演

「DNAからみた日本人の起源」 宝来 聰先生 (総合研究大学院大学教授)

2. シンポジウム／ワークショップ

シンポジウム1：「細胞治療：現時点での治療成績と今後の展開」

1. 腫瘍に対する同種細胞療法

高見昭良 先生 (金沢大学細胞移植学)

2. 癌ペプチド療法の現時点での治療成績

山田 亮 先生 (久留米大学先端癌治療研究センター)

3. 悪性黒色腫に対するペプチドワクチン療法

角田卓也 先生 (東大医科研外科・臓器細胞工学)

4. 固形癌に対するミニトランスプラントの現状と将来

牧本 敦 先生 (国立がんセンター中央病院)

5. WT1をターゲットにした癌治療

杉山治夫 先生 (大阪大学病態生体情報学)

シンポジウム2：「移植医療とHLA」

1. 臍帯血移植 加藤俊一 先生 (東海大学細胞移植)
2. 造血幹細胞移植 森島泰雄 先生 (愛知県がんセンター)
3. 心移植 福嶋教偉 先生 (大阪大学臓器制御外科)
4. 肝移植 菅原寧彦 先生 (東京大学移植外科)
5. 腎移植 福西孝信 先生 (兵庫県立西宮病院)

ワークショップ：「HLAタイピング・移植検査の最前線」

1. 蛍光ビーズを用いたリバーSSOについて
 柏瀬 貢一 先生 (東京都赤十字血液センター検査三課)
2. SBT法による移植時のHLAタイピング
 渡辺 真穂 先生 (福岡大学医学部第4内科)
3. DNAマイクロアレイによるHLAタイピング
 川井信太郎 先生 (湧永製薬創薬研究所バイオ診断研究室)
4. 移植医療における抗HLA抗体測定の意義
 小原 節子 先生 (名古屋第二赤十字病院組織適合検査室)
5. 造血幹細胞移植の生着確認検査－キメラ検査－
 丸屋 悦子 先生 (特定非営利活動法人HLA研究所)
6. STRを利用した移植後キメリズム解析
 白濱 秀也 先生 (エスアールエル遺伝子・染色体解析センター)

3. 教育講演

教育講演1：癌細胞の排除におけるHLAの役割

講 師：西村泰治 先生 (熊本大学大学院医学研究科 免疫識別学講座)

教育講演2：HLAテトラマーによる抗原特異的CD8 T細胞の解析

講 師：滝口雅文 先生 (熊本大学エイズ学研究センター ウイルス制御分野)

教育講演3：HLA分子とT細胞応答

講 師：松下 祥 先生 (埼玉医科大学 免疫学教室)

教育講演4：妊娠免疫とHLA クラスIb

講 師：石谷昭子 先生 (奈良県立医科大学 法医学教室)

(本教育講演は、認定組織適合性技術者制度の講習会を兼ねております)

4. 一般演題 (口演またはポスター)

今回は口演形式の発表を出来る限り多数の方にして頂けるようプログラム編成を行います。発表形式(口演発表とポスター発表)につきましてはプログラム委員会に一任下さいますようお願いいたします。

なお、演題募集は4月30日に締め切りました。

5. その他: ランチョンセミナー, モーニングセミナー, ナイトセミナー等を企画しております。

6. 研究発表形式通知

研究発表形式および発表日時につきましては、2002年6月中旬に通知致します。

II. 大会参加

大会参加費(7,000円)は大会当日受付でお支払い下さい。

ネームカード(領収書兼用)をお渡し致します。ネームカードがないと会場には入れません。

III. 懇親会

2002年9月24日(火)、18時頃より懇親会を開催致します。学会受付にて大会参加費をお支払いの際に、お申し込み下さい。懇親会費は3,000円です。

IV. 宿泊と航空券等のご案内

今回は特定の旅行会社に依頼をいたしておりません。インターネット等を御利用の上、各自お手配くださいます様お願いいたします。

御参考: 川越プリンスホテル www.princehotels.co.jp/kawagoe/

〒350-8501 埼玉県川越市新富町1-22 (大会会場)

TEL: 049-227-1111 FAX: 049-227-1110

川越東武ホテル www.tobu.co.jp/hotel/kawagoe/index.html

〒350-1122 埼玉県川越市脇田町29-1 (会場まで徒歩3分)

TEL: 049-225-0111 FAX: 049-225-0607

JR各社 www.jr.cyberstation.ne.jp/

全日空 www.ana.co.jp/

日本航空 www.jal.co.jp/

V. 大会についてのお問い合わせ

〒350-8550 (施設固有番号)

埼玉県川越市鴨田辻道町1981

埼玉医科大学総合医療センター 輸血・細胞治療部内

第11回日本組織適合性学会大会事務局

TEL : 049-228-3506 FAX : 049-226-3091

E-mail : smchla@saitama-med.ac.jp

HP : www.saitama-med.ac.jp/kawagoe/index.html

(できるだけFAXまたはE-mailを御利用ください)

VI. その他

- 1) 第6回HLA DNAタイピングQCワークショップ集会は、平成14年9月23日(月: 祝) 12:00~16:00に大会と同会場にて開催されます。引き続き、同会場で認定講習会が開催される予定です。
- 2) その他の情報に関しては、今後学会誌 MHC 誌上および日本組織適合性学会ホームページ上で更新して参ります。

平成14年度 認定 HLA 検査技術者特例認定実施要領

日 本 組 織 適 合 性 学 会
 会 長 猪 子 英 俊
 組 織 適 合 性 技 術 者 認 定 制 度 委 員 会
 委 員 長 佐 治 博 夫

認定 HLA 検査技術者及び認定組織適合性指導者認定制度規則（以下「規則」という。）に基づき認定 HLA 検査技術者資格特例認定を下記のごとく実施する。また、この特例認定は、本年度に限って実施する。なお、この資格特例認定では、規則第 9 条第 4 項の試験が免除される。実技研修は、講習会の前に受講しておかなければならない。なお、研修場所・日時に関しては後日申請者に文書で通知する。平成 15 年度に受験を予定している者は、講習会のみ今年度に受講しておくこと。平成 16 年度以降に受験を予定している者も講習会の受講は可能である。

- 1 申請資格： 規則第 8 条第 1 項の資格条件を満たす者。ただし、第 3 号は除く。なお、第 2 号の業務とは、組織適合性に関する検査、研究及び教育をいう。
- 2 申請書提出期限： 平成 14 年 6 月 21 日（金曜日）までに到着するよう簡易書留で下記の事務局へ送付すること。
- 3 申請書送付先： 〒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内
組織適合性技術者認定制度委員会事務局
電話 0463-93-1121 内線 2653
- 4 提出書類： (1) 認定 HLA 検査技術者特例認定申請書と別記様式第 2
(2) 申請料振り込み用紙の写し
(3) 80 円切手を貼った返信用封筒
必要な申請書類は本誌に綴じ込められている。なお、別記様式第 2 の 5 の貼付用台紙には学会参加証などのコピーを貼り付けること。ただし、講習会修了証の添付は不要である。また、過去の学会参加証がないものについても単位計算に算入してよいが、学会参加証の添付は必ずしも必要ない。
- 5 申請料： 20,000 円
振込先
東京三菱銀行東海大学病院出張所
普通預金 0311804
JSHI 認定制度委員会事務局 猪子 英俊
いったん納入した受験料は返却しない。
- 6 講習会： 日 時：平成 14 年 9 月 23 日（月曜日）16 時～18 時（予定）
会 場：川越プリンスホテル
参加費：未定
- 7 実技研修会： 日時、場所等は申請者に文書で通知する。
- 8 その他： 申請時までに平成13年度分までの会費が納入済みであること。
追記. 資格審査基準証明書（別紙様式第2の1）の所属長欄への署名ならびに捺印は、原則として不要である。

平成14年度 認定組織適合性指導者資格特例認定実施要領

日本組織適合性学会
 会長 猪子 英俊
 組織適合性技術者認定制度委員会
 委員長 佐治 博夫

認定 HLA 検査技術者及び認定組織適合性指導者認定制度規則（以下「規則」という。）に基づき認定組織適合性指導者資格特例認定を下記のごとく実施する。また、この資格特例認定は、平成 14 年度と 15 年度の 2 年間に限って実施する。なお、この資格特例認定では規則第 13 条第 2 項の試験が免除される。

- 1 申請資格： 規則第 12 条第 1 項の資格条件を満たす者。ただし、第 1 号及び第 4 号は除く。なお、第 3 号の業務とは、組織適合性に関する検査、研究及び教育をいう。
- 2 申請書提出期限： 平成 14 年 6 月 21 日（金曜日）までに到着するよう簡易書留で下記の事務局へ送付すること。
- 3 申請書送付先： 〒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内
組織適合性技術者認定制度委員会事務局
電話 0463-93-1121 内線 2653
- 4 提出書類： (1) 認定組織適合性指導者特例認定申請書と別記様式第 2
(2) 申請料振り込み用紙の写し
必要な申請書類は本誌に綴じ込められている。なお、別記様式第 2 の 5 の貼付用台紙には学会参加証などのコピーを貼り付けること。ただし、講習会修了証の添付は不要である。また、過去の学会参加証がないものについても単位計算に算入してよいが、学会参加証の添付は必ずしも必要ない。
- 5 申請料： 50,000 円
振込先
東京三菱銀行東海大学病院出張所
普通預金 311804
JSHI 認定制度委員会事務局 猪子 英俊
いったん納入した受験料は返却しない。
- 6 講習会： 第 11 回日本組織適合性学会大会中の指定した教育講演
- 7 その他： 申請時まで平成13年度分までの会費が納入済であること。
追記 資格審査基準証明書（別紙様式第2の1）の所属長欄への署名ならびに捺印は、原則として不要である。

〔原著論文〕 Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I Expression in Polymorphonuclear Leukocytes by Triggering CD16 Antigen: Different Effects of Two Clones of anti-Fc γ RIII Monoclonal Antibody

Motoko Nishimura¹⁾, Yoshihide Ishikawa¹⁾, Shigeki Mitsunaga²⁾

¹⁾Department of Research, Tokyo Metropolitan Red Cross, Blood Center, Tokyo, Japan

²⁾Department of Research, The Japanese Red Cross, Central Blood Center, Tokyo, Japan

(Received January 17, 2002)

Summary

Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) constitutively express major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on their surface. In spite of the prominent roles of PMNs in host immune defense, the roles of MHC class I molecules in PMNs, such as presenting intracellularly processed antigens to CD8⁺ T cells, or preventing the cytotoxic effect of natural killer (NK) cells by their upregulated expression levels, have not been fully investigated thus far. PMNs express two low-affinity Fc γ receptors, Fc γ R II (CD32) and Fc γ R III (CD16). The intracellular signaling pathway of PMNs is activated by triggering or cross-linking CD16, resulted in the upregulation of MHC class I expression. We found that the expression levels of MHC class I molecules of PMNs could be downregulated by triggering CD16, but not by triggering CD32.

Keywords : MHC class I, PMN, Fc γ Rs, Anti-CD16 mAb, NA1 / NA2 antigens.

Introduction

Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) play important roles in host immune defense through phagocytosis, clearance of immune complexes and production of reactive oxygen species (ROS), and induce phagocytic inflammatory responses against a variety of microbial products. Inflammatory responses involve adhesion molecule and chemokine receptor upregulation, and calcium release by cross-linking β 2 integrin, CD11b

and CD18. PMNs constitutively express major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on their surface. MHC class I molecules present intracellularly processed nonself antigens to CD8⁺ T cells, such as microorgans, and tumor-derived peptides. A recent report indicated that MHC class II molecules observed on the surface of PMNs activated by lipopolysaccharide (LPS) or granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) may play a role in

Corresponding author : **Motoko Nishimura, Ph.D.**
Department of Research, Tokyo Metropolitan Red Cross, Blood Center
4-1-31 Hiroo, Shibuya-ku, Tokyo 150-0012

Phone: 03-3406-1211
Fax: 03-3406-7892
E-mail:

presenting antigens to T cells (1, 2). On the other hand, the roles of MHC class I on the PMN cell surface have not been fully investigated thus far. PMNs constitutively express two low-affinity receptors for the Fc fragments of IgG (Fc γ R II and Fc γ R III) that couple humoral and cellular immune responses by triggering immune complexes (3, 4, 5). By triggering or cross-linking, Fc γ Rs easily activate the intracellular signal transduction pathway. Our study shows that downregulation of MHC class I molecules in PMNs may be triggered by Fc γ R III (CD16) in the presence of anti-CD16 monoclonal antibodies (mAbs), but not by Fc γ R II (CD32) in the presence of anti-CD32 mAb.

Materials and Methods

Cell culture

PMNs were prepared from the citrated anti-coagulant treated peripheral bloods samples from several healthy individuals using the conventional method with Ficoll density gradient centrifugation at 1,700 rpm for 20 minutes. The lower layer PMNs of red blood cells was harvested, followed by red blood cell lysis with NH_4Cl (6). The purity of the obtained PMNs was $98.8 \pm 3.2\%$ [mean \pm standard deviation (SD)] in 10 randomly selected results from 123 separate PMN preparations, assessed by staining the cells with fluorescence isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human neutrophil-specific mAb, namely, anti-CD16b mAb (clone 1D3; Immunotec, France), and by flow cytometry (FCM). The viability of the PMNs was $>98\%$ as assessed by trypan blue dye exclusion. PMNs were cultured in the RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated (56°C for 30 minutes) fetal calf serum (FCS; HyClone, UT, USA) in the presence or absence of 200-fold-diluted anti-CD16 mAbs, clone OKNK (IgM, Ortho Diagnostic Systems K. K., Japan) or clone 3G8 (IgG₁, BD Pharmingen, CA, USA) or anti-CD32 mAb (Immunotec, France) at 37°C for 3–48 hours at a cell concentration of 2×10^6 cells mL^{-1} .

Immunofluorescence analysis

Freshly prepared PMNs cultured for three, eight or 24

hours in the presence or absence of anti-CD16 mAbs, clone OKNK, clone 3G8 or anti-CD32 mAb, were harvested and stained with 40-fold-diluted phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-human MHC class I (clone W6/32; Serotec, UK) at 4°C for 30 minutes. These cells were then washed twice with FCM buffer [phosphate-buffered saline (PBS) + 0.2% bovine serum albumin (BSA) + 0.1% NaN_3], followed by FCM using Cytron (Ortho Diagnostic Systems K. K., Japan). In the case of staining with PE-conjugated anti-CD45 (DAKO, Denmark), anti-CD32 or anti-CD14 mAbs (DAKO, Denmark), we used essentially the same method as that used in staining MHC class I molecules from freshly prepared PMNs or 24-hour-cultured PMNs in the presence of 200-fold-diluted anti-CD16 mAbs, OKNK or 3G8. In another experiment, freshly prepared PMNs were subjected to direct staining with 40-fold-diluted FITC-conjugated anti-CD16 mAbs, clone OKNK or clone 3G8, at 4°C for 30 minutes, and then washed twice with FCM buffer. Staining profiles were also analyzed using Cytron.

Competitive treatment of two clones of anti-CD16 mAb

Freshly prepared PMNs were primarily treated with 40-fold-diluted mAbs, clone OKNK or clone 3G8, at 4°C for 30 minutes. After washing twice with FCM buffer, 40-fold-diluted FITC-conjugated clone OKNK was added to clone 3G8-pretreated PMNs. In contrast, 40-fold-diluted FITC-conjugated clone 3G8 was added to clone OKNK-pretreated PMNs. After staining at 4°C for 30 minutes, PMNs were washed twice with FCM buffer and staining profiles were analyzed with Cytron. As negative control, FITC-conjugated mouse IgG (DAKO) was added to PMNs that were pretreated with clone OKNK or clone 3G8.

Assessment of cytotoxicity against PMNs by allogeneic peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

The assessment of PMN susceptibility to cytotoxic activity of PBMCs was performed according to the conventional ^{51}Cr -release assay. PMNs were cultured for 24 hours in the presence or absence of 200-fold-diluted clone OKNK at a cell concentration of $2 \times 10^6/\text{ml}$ in the

RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. Thereafter, PMNs were labeled with ^{51}Cr at $50 \mu\text{Ci}/1 \times 10^6$ cells at 37°C for one hour. After the incubation period, PMNs were washed three times with the RPMI 1640 medium supplemented with 1% FCS and used as target cells. Effector allogeneic PBMCs were prepared from the blood of several healthy individuals by Ficoll gradient centrifugation, obtaining the mononuclear cell layer that was washed three times with the RPMI 1640 medium supplemented with 1% FCS. Target cells were inoculated in 96-well round-bottomed plates (1×10^6 cells/well, $100 \mu\text{l}$ of the RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. Then effector cells were added at a target : effector ratios of 1:10, 1:20, 1:40 and 1:80 at $100 \mu\text{l}$ /well with containing the RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. After centrifugation at 1,000 rpm for 10 minutes to facilitate contact between target and effector cells, plates were incubated at 37°C for six hours. Then centrifugation was performed at 2,000 rpm for 10 minutes; $100 \mu\text{l}$ of culture supernatants was harvested and radioactivities were counted with a γ counter. Specific percentage lysis was calculated using the following formula: $(\text{cpm of samples} - \text{cpm of spontaneous lysis} / \text{cpm of maximum lysis}) \times 100$. Spontaneous release was assessed in the wells of the target alone and maximum lysis was obtained from wells to which Triton X-100 (final 0.1% V/V) was added instead of effector cells.

Results

Unexpectedly, anti-CD16 mAb treatment induced the downregulation of MHC class I molecule expression, that is, a slight downregulation was induced in clone 3G8-treated PMNs, whereas complete downregulation was induced in clone OKNK-treated PMNs (Figure 1). This downregulation was already observed three hours after mAb treatment. The downregulation of expression of MHC class I molecules continued for 48 hours in clone OKNK-treated PMNs, but completely recovered at 72 hours (data not shown). In contrast, in clone 3G8 treatment, slight downregulation of MHC class I

molecules was observed at three hours, which gradually recovered at eight hours and completely recovered at 24 hours (Figure 1). On the other hand, downregulation was not observed in the presence of anti-CD32 mAb (Figure 2). However, the same staining profile was observed in the case of FITC-conjugated anti-CD16 mAbs in freshly prepared PMNs (Figure 3). A slightly competitive effect was observed in clone 3G8-pretreated PMNs for clone OKNK binding, but not in clone OKNK-pretreated PMNs for clone 3G8 binding (Figure 4). Moreover, the downregulation of cell surface antigens other than MHC class I, such as CD11a, CD14 and CD45 was not observed. For instance, almost the same expression levels of CD45 were observed in PMNs pretreated with clone OKNK and clone 3G8 for 24 hours (Figure 5). It is generally considered that cells that do not express MHC class I molecules are susceptible to cytotoxicity of NK cells in PBMCs. Thus, we performed ^{51}Cr -release assay using PMNs that were cultured in the presence or absence of clone OKNK for 24 hours. Notable killing was observed in clone OKNK treated PMNs, but not PMNs cultured in the medium alone (Figure 6). Unexpectedly, although slightly less than allogeneic PBMCs, autologous PBMCs also displayed eminent killing activity (Figure 6).

Discussion

The mechanism of the downregulation of MHC class I molecule expression has not yet been clarified. It is a completely reverse phenomenon to the upregulation of MHC class I molecules in tumor cells and virus-infected cells to escape from natural-killer (NK)-cell surveillance (7, 8). It is speculated that PMNs that are activated by triggering CD16 molecules respond within three hours and attain the state of being capable of playing roles in host immune defense. After performing several roles in host immune defense, PMNs may downregulate MHC class I molecule expression, resulting in susceptibility to the cytotoxic effect of NK cells, to restrain inflammatory reactions, in which PMNs play central roles through ROS production, phagocytosis, and clearance of immune

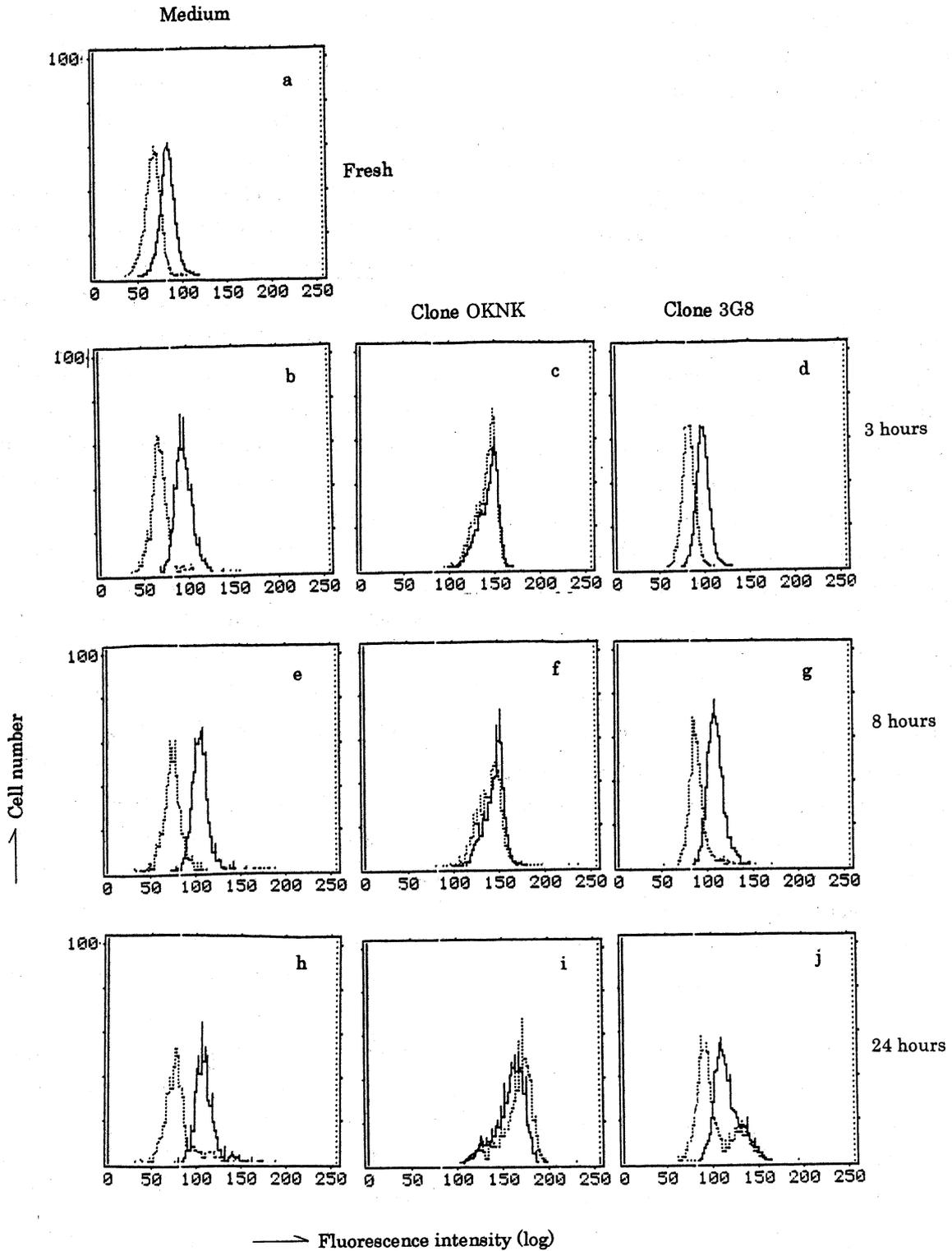


Figure 1.

FCM profiles of MHC class I molecule expression in freshly prepared PMNs (a), PMNs cultured in medium alone (b, e, h), PMNs cultured in the presence of clone OKNK (c, f, i) or clone 3G8 (d, g, j). Cells were harvested at the indicated time and stained with PE-conjugated anti-MHC class I mAb (—) or isotype-matched PE-conjugated mouse IgG (-----) as negative control. Representative results from five independent experiments are shown.

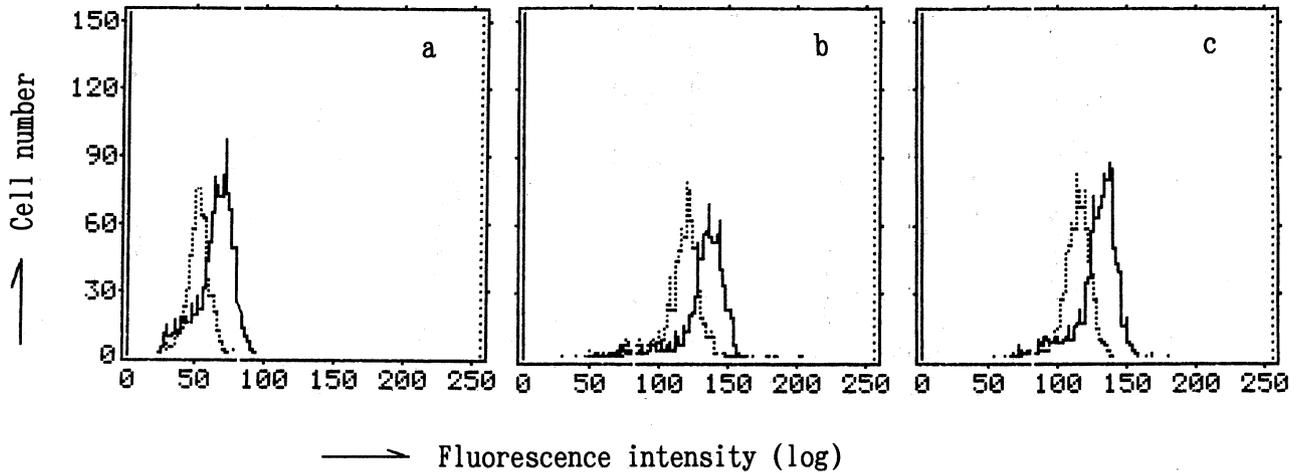


Figure 2.

FCM profiles of freshly prepared PMNs stained with FITC-conjugated anti-MHC class I mAb, freshly prepared PMNs (a), 24-hour cultured PMNs (b) and 24-hour cultured in the presence of anti-CD32 mAb (c), and staining profiles of isotype-matched FITC-conjugated mouse IgG (----) as negative control. Representative results from three independent experiments are shown.

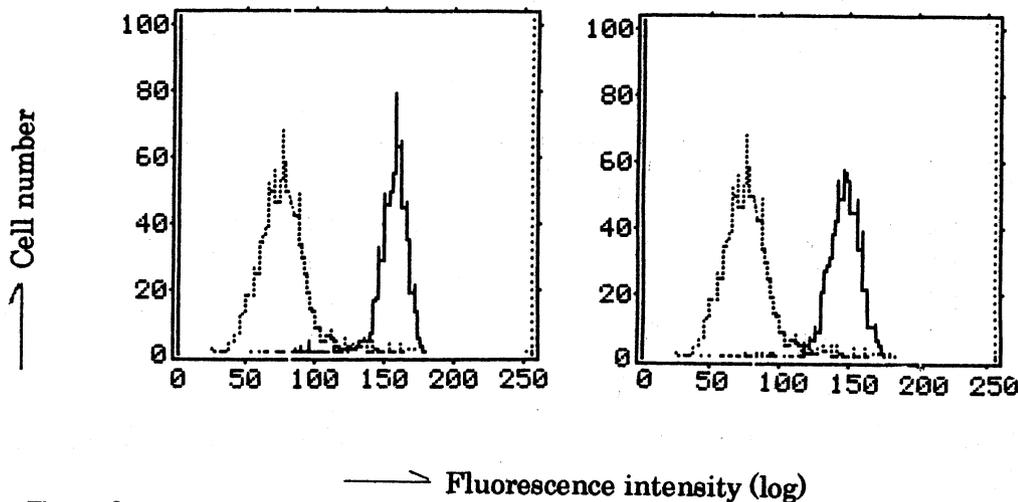


Figure 3.

FCM profiles of freshly prepared PMNs stained with FITC-conjugated anti-CD16 mAbs, clone OKNK (left) and clone 3G8 (right) (—). Staining profiles of isotype-matched FITC-conjugated mouse IgG (----) as negative control. Representative results from three independent experiments are shown.

complexes.

In line with these notions, other clone of mAb against low-affinity receptor for IgG (CD32), except for using in this study also might cause downregulation of MHC class I expression. This is remained to be resolved.

The different effects of the two mAbs have not been

explained thus far. One possible reason for the different effects is that clone OKNK has a strong potency for activating the intracellular signal pathway followed by downregulation of MHC class I molecule expression, whereas clone 3G8 has a weak potency. Alternatively, from the observation that the basal level of

fluorescence intensity was higher in PMNs that were treated with clone OKNK than in those are treated with clone 3G8, it was speculated that clone OKNK has the effect of increasing autofluorescence. than that of clone 3G8.

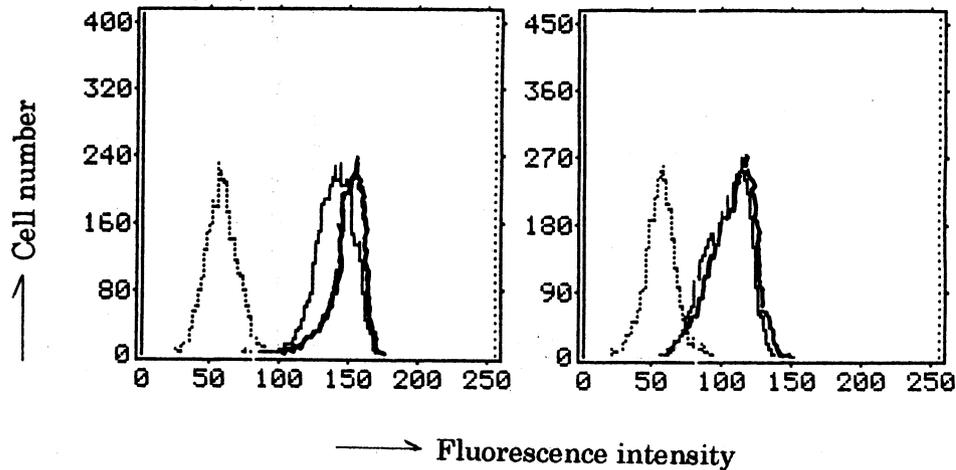


Figure 4.

FCM profiles obtained by direct staining with FITC-conjugated clone OKNK of PMNs pretreated with clone 3G8 (left, thin line) or without clone 3G8 (left, thick line), or by direct staining with FITC-conjugated clone 3G8 of PMNs pretreated with clone OKNK (right, thin line) or without clone OKNK (right, thick line). Staining profiles of isotype-matched FITC-conjugated mouse IgG as negative control (-----). Representative results from three independent experiments is shown.

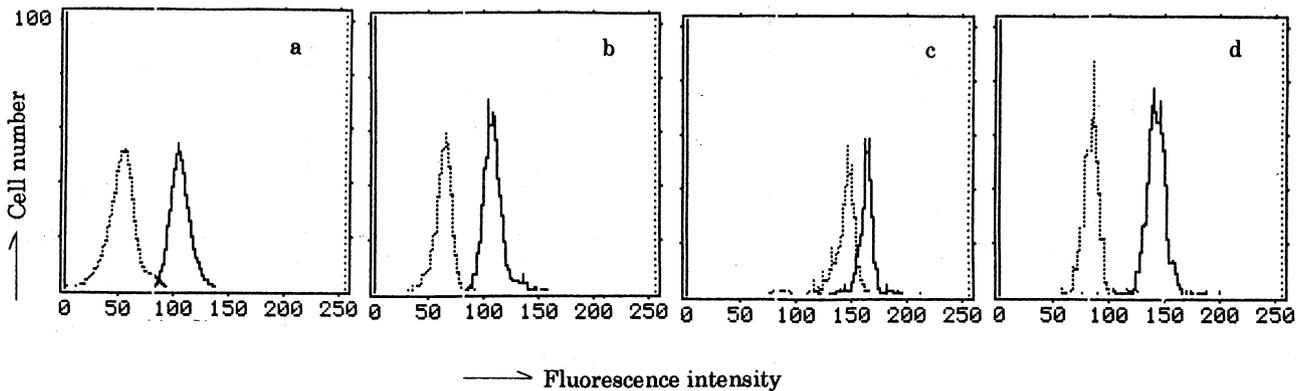


Figure 5.

FCM profiles of CD45 expression in freshly prepared PMNs (a), PMNs cultured in the medium alone in the absence of primary mAbs (b), PMNs cultured for 24 hours and pretreated with clone OKNK (c) or clone 3G8 (d), were harvested, washed and stained with PE-conjugated anti-CD45 mAb (—). Staining profiles of isotype-matched PE-conjugated mouse IgG as negative control (-----). Representative results from three independent experiments are shown.

A slightly competitive effect was observed in clone 3G8-pretreated PMNs for clone OKNK binding, but not

seen in OKNK-pretreated PMNs for clone 3G8 binding. The binding ability may be more flexible in clone OKNK than in clone 3G8. Alternatively, the binding site for

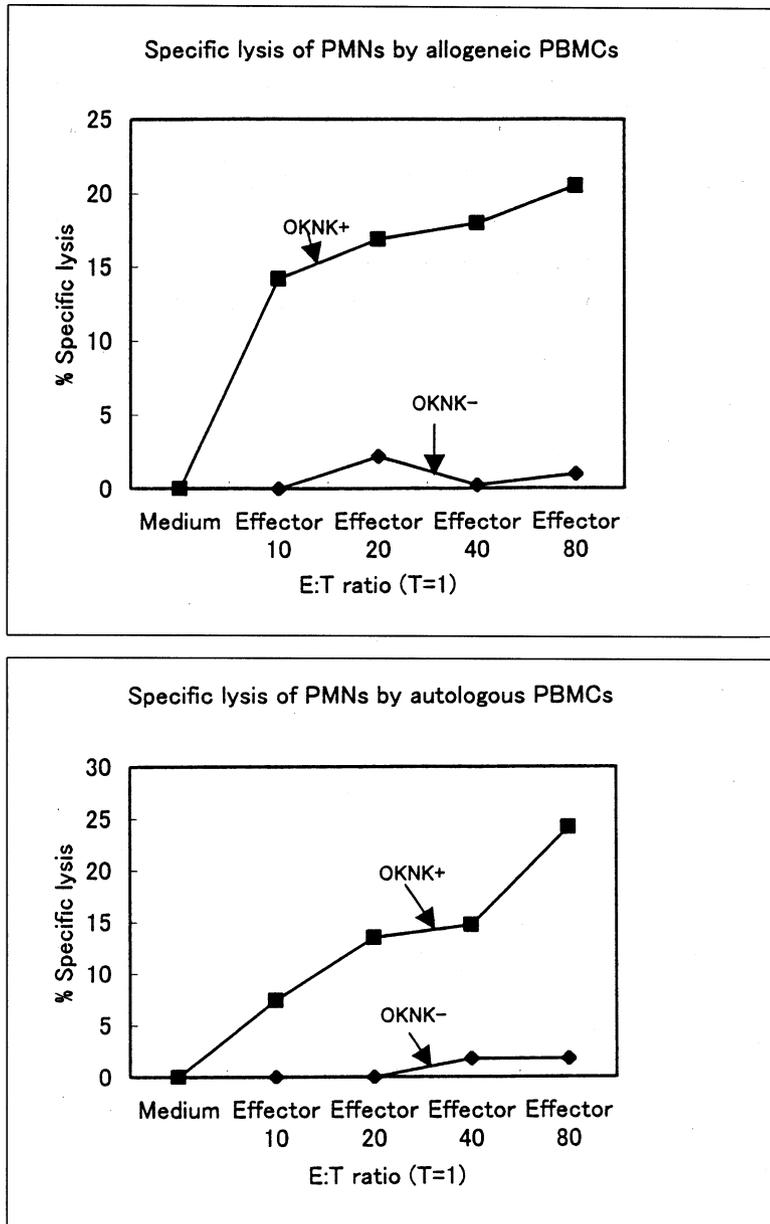


Figure 6.

Cytotoxicity of allogeneic PBMCs (upper) and autologous PBMCs (lower) against ^{51}Cr labeled PMNs cultured in the presence or absence of clone OKNK for 24 hours at the indicated effector : target ratios. After six-hour incubation, radioactivities of culture supernatants were counted with a γ counter.

clone OKNK may be partially blocked by the pretreatment with clone 3G8, suggesting that the overlapping binding site has a rather stronger affinity for

clone 3G8 than clone OKNK. Another possibility is that clone 3G8 can be completely bound without the overlapping site.

Antibodies against neutrophil-specific antigens, such as NA1 and NA2 bind to Fc γ R III, are considered to cause transfusion-related acute lung injury (TRALI) (9, 10, 11), when these antibodies are present in blood transfusion products. We confirmed that PMNs from NA1 homozygous donors exhibited downregulation of MHC class I molecule expression following anti-NA1 mAb MG38 treatment (Nichrei Co., Ltd., Japan), but not following anti-NA2 mAb GRM1 treatment (Southern Biotechnology Associates, Inc. AL, USA) and vice versa (data not shown).

Unexpected result that PMNs downregulated MHC class I molecules were killed by not only allogeneic PBMCs but autologous PBMCs may be reasonable. Because a possible explanation is deduced from the result from the result that PMNs completely finished their several roles in inflammatory site could rapidly be cleared by scavenger cells in PBMCs, probably natural killer (NK) cells may contributed to relieve inflammatory reactions in vivo.

References

1. Fanger NA, Lin C, Guyre PM, *et al.*: Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophil: Proliferation in the presence of super antigen, but not tetanus toxoid. *Blood* **89**:4128-4135, 1997.
2. Radska M, Iking-Konert S, Andrassy K, *et al.*: Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology* **101**:521-530, 2000.
3. Huizinga TWJ, Kleijer M, Tetterco PA, *et al.*: Biallelic neutrophil Na-antigen system is associated with a polymorphism on the phospho-inositol-linked Fc γ receptor III (CD16). *Blood* **75**:213-217, 1990.
4. Huizinga TWJ, Kuijpers RW, Kleijer M, *et al.*: Maternal genomic neutrophil Fc γ RIII deficiency leading to neonatal isoimmune neutropenia. *Blood* **76**:1927-1932, 1990.
5. Stroncek DF, Skubiz KM, Plachta LB. *et al.*: Alloimmune neonatal neutropenia due to an antibody to the neutrophil Fc- γ receptor III with maternal deficiency of CD16 antigen. *Blood* **77**:1572-1580, 1991.
6. Chin-Yee I, Keeney M, Krueger L, *et al.*: Supernatant from stored red cells activates neutrophils. *Transfusion Medicine* **8**: 49-56, 1998.
7. Kaufman DS, Schoon RA, Leibson PJ.: MHC class I expression on tumor cell targets inhibits natural-killer cell-mediated cytotoxicity without interfering with target recognition. *Immunol* **150**:1429-1436, 1993.
8. Liao NS, Bix M, Zulstra M, *et al.*: MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* **253**:199, 1991.
9. Zupanska B, Chrynowska M, Konopla L.: Transfusion-related acute lung injury due to granulocyte-agglutinating antibody in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion* **39**:944-947, 1991.
10. Popovsky MA, Davenport RD.: Transfusion-related acute lung injury: femme fatale? *Transfusion*, **41**:312-315, 2001.
11. Leach M, Vora AJ, Jones DA. *et al.*: Transfusion-related acute lung injury (TRALI) following autologous stem cell transplant for relapsed acute myeloid leukemia: A case report and review of the literature. *Transfusion Medicine*, **8**:333-337, 1998.

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	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。

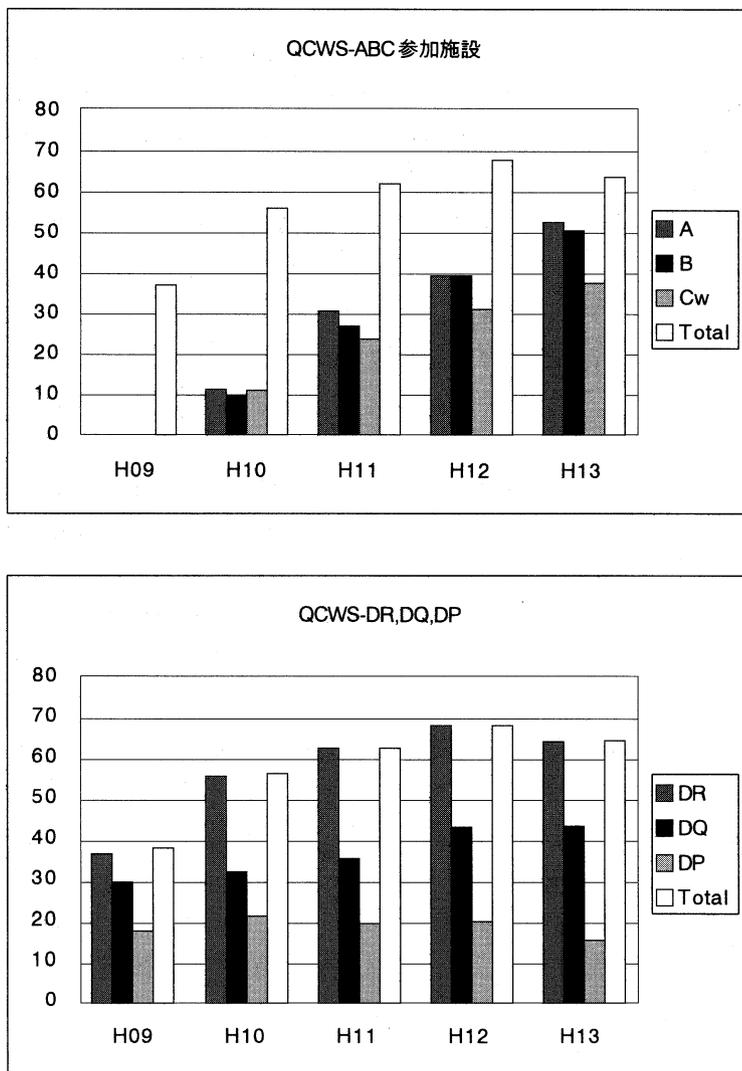


図1 過去5年間(平成9年~13年)のHLA-QCワークショップ参加施設。上段:クラスI, 下段:クラスII

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る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法のみを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										2	2											5
57	6	6	6	6			4	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											
*12	1201/03/04/05																								
	1202															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			
*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																								
*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ルが異なってくる。A*02について はスコア提出中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	4	8										8	11	12	52			F318
9	H1302													8	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	12	○			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																						8	01	15				B065
48	H1304		8	8																						8	0101/	1501/			0101/	A764
57	H1304																															

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			10								
*0402		2		4				8		10				14				
*0403			3					8		9								
*0404				4				8		9								
*0405				4	5		7			9								
*0406			3			6		8		9								
*0407			3				7			9								
*0408				4			7			9								
*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										*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		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			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
11D	+	Cw*04	Cw*0605	11D	-			8D	+	Cw*04	Cw*15
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
12F	-			12F	+	Cw*04	Cw*12	9F	+	Cw*04	Cw*12
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															
60	8	8																			8	8															
H1305 - 34	8	8																			8	8															
60	8	8																			8	8															
H1306 - 34	8																					8	8														
60	8																					8	8														
7	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。

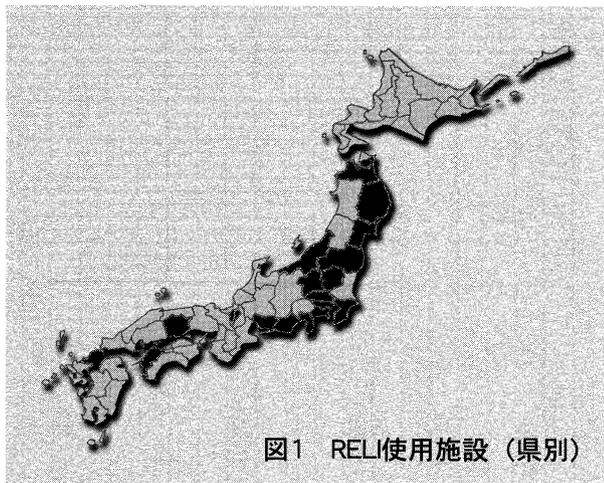


図1 RELI使用施設 (県別)

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ふであろう。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3 HLA-B ローカスの反応と判定結果

検体番号	施設 番号	プローブ No. (ストリップ1)																																					
		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	33	34	35	36	37	
#H1301	31	2			4	8	8		8				4				8	8	8										8				8				8	8	
	54	4			6	8	8		8				6				8	8	8										8				8				8	8	
	37					4		6		8							8	8	8										8				8				8	6	
#H1302	31			8			8		8					8											8			8				8					8		
	54			8			8		8					8											8			8				8					8		
	37			2			6		6					2					8						8			8				8			4				4
#H1303	31		8				6			8				8				8	8	8																8			8
	54		8				8			8				8				8	8	8																8			8
	37		8				4			8				4				8																		8			8
#H1304	31		6		6		8	4		8					2	8		8	8	8																	4		8
	54		8		8		8	8		8					8	8		8	8	8																	8		8
	37		2		4		6			6					2	2	6	4																			8		8
#H1305	31				8		8	6		8					8			8	8																		4		8
	54				8		8	8		8					8			8	8																		6		8
	37				8		6	2		8					6			8	6																		2		8
#H1306	31	2			4		8			8				6				8	8	8																		4	
	54	4			6		8			8				8				8	8	8																		8	
	37	2			2		4			8				4				8	8	8																		8	

検体番号	施設 番号	プローブ No. (ストリップ2)																																				判定結果	
		38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	HLA-B	HLA-B													
#H1301	31					8							6		8																				8				
	54					8							4		8																				8				
	37					8							2		8																				8				
#H1302	31									8				8				8																					
	54									8				8				8																					
	37									8				8				6																					
#H1303	31	8											4																										
	54	8											4																										
	37	8											2																										
#H1304	31	8		8			8							8																						2			
	54	8		8			8							8																						6			
	37	4		8			4							8																									
#H1305	31	8						8	8	8				8	8																								
	54	8						8	8	8				8	8																								
	37	8						4	6	6				6	8																								
#H1306	31	8												8																						4			
	54	8												8																						6			
	37	8												8																						2			

(反応スコア1は空白で表示)

- | | | | |
|---------------|--------|---------------------|------------------------------|
| Probe No.1 : | weak : | 142 AC 143 : | B13, B21, B27, B40, B44, B47 |
| Probe No.4 : | weak : | 141 CG 142 : | B15, B35, B53, B17, B22, B59 |
| Probe No.13 : | weak : | 272 C : | B13, B15, B18, B40, B44, B52 |
| Probe No.22 : | weak : | 353 T-A-----A 361 : | B35, B44, B53, B58 |
| Probe No.30 : | weak : | 419 TA 420 : | B13, B21, B54, B55, B59 |
| Probe No.48 : | weak : | 311 C-----T-C319 : | B27, B37, B*4701 |
| Probe No.52 : | weak : | 412 A-----A 419 : | B8, B40b, B5, B57, B78 |
| Probe No.56 : | weak : | 97 T-----T--G 106 : | B7, B16, B67, B81, B*1401 |
| Probe No.18 : | FP : | 292 T : | B5, B12, B15, B35, B40 |

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)。

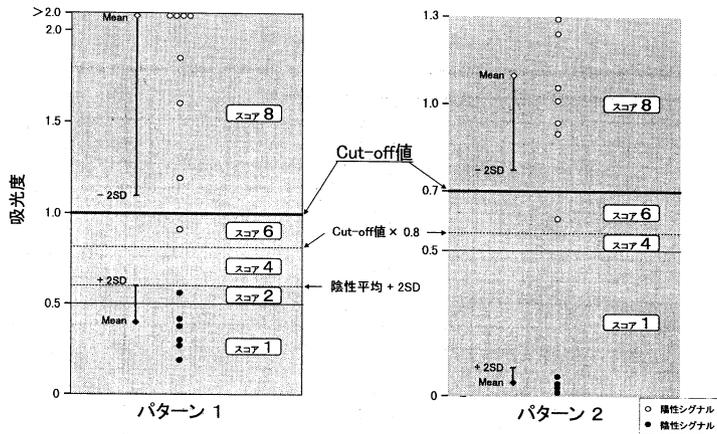


図 1 測定値（吸光度）スコア化の基準

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	8	1	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	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	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	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	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	1	8	8	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1501/12/14/+	4006		
	64	1	1	4	1	1	6	1	8	8	1	2	1	1	4	1	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	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	1	8	1	8	1	1	1	0102/03	0303	
	3	8	8	8	1	1	1	1	8	8	1	8	1	8	8	8	8	1	8	1	8	1	1	1	0102/03	0303	
H1306	4	8	1	8	1	1	8	1	8	1	1	8	1	8	8	8	8	1	8	1	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。

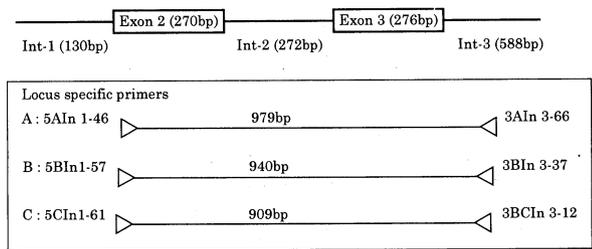


図1 HLAクラスIタイピング用プライマー

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.

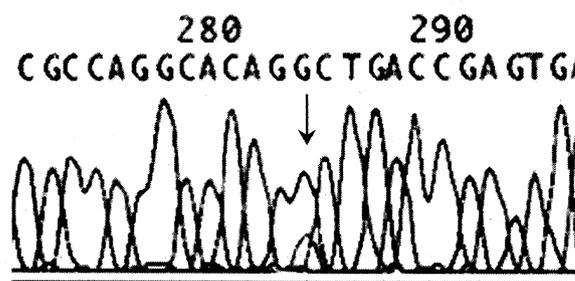


図2 sample #1302のHLA-C exon2 forward sequencing

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由来する。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.

日本組織適合性学会 会告

A 認定制度における教育項目について

日本組織適合性学会では、組織適合性技術者認定制度の立ち上げに際して委員会を設置して準備にあたっております。その一環として教育部会では、認定HLA検査技術者および認定組織適合性指導者の認定を受けようとする者が修得しておくべきHLA (MHC) に関する知識の項目について、下記のようなリストを作成致しました。教育部会では、これらの項目の教育をめざして認定試験受験および認定更新に必要な講習会、ならびに認定HLA検査技術者の認定試験受験に必要な実技研修会を企画する予定です。

組織適合性技術者認定制度委員会・教育部会

なお認定組織適合性指導者は下記のすべての知識を修得していることが好ましく、また認定HLA検査技術者においては*印で示した項目を理解していることが要求されます。

【HLAに関する基礎知識】

I. HLA (MHC) の概論

- 1) HLA研究の歴史（発見の経緯など）
- * 2) 研究方法の概略（血清学、遺伝子、タンパク質、細胞機能）
- * 3) 遺伝に関する基礎知識（遺伝様式、遺伝子の基本構造、複製、転写、翻訳、染色体）
- * 4) 集団遺伝学の基礎（遺伝子変異、多型、抗原頻度、遺伝子頻度、ハプロタイプ、連鎖不平衡、人種差）
- 5) HLA対立遺伝子（アリル）の命名法
 - * i) ワークショップ(国際、アジア/オセアニア、国内)の必要性と歴史
 - * ii) 抗原特異性レベルでの命名法
 - * iii) 遺伝子レベルでの命名法

II. HLA (MHC)の構造と発現

- * 1) HLA遺伝子領域の構成
- * 2) HLAクラスI分子の種類、分類
- * 3) HLAクラスII分子の種類、分類
 - 4) HLAクラスI遺伝子の構造と発現制御
 - 5) HLAクラスII遺伝子の構造と発現制御
- * 6) HLAクラスI、クラスII分子、遺伝子の多型の特徴
- * 7) HLA領域の対立遺伝子の頻度、抗原頻度、ハプロタイプ頻度
 - 8) HLA領域に存在するその他の遺伝子について
 - 9) MHCの分子進化と系統発生
 - 10) HLA クラスI 様分子 (MIC, CD1など) の特徴

III. HLA (MHC)の機能

- * 1) 古典的HLAクラスI分子 (A, B, C) の機能
- * 2) 古典的HLAクラスII分子 (DR, DQ, DP) の機能

- 3) 非古典的HLAクラスI分子 (E, F, G) の機能
- 4) 非古典的HLAクラスII分子 (DM, DO) の機能
- 5) HLAクラスI様分子 (MIC, CD1など) の機能
- 6) クラスIII領域内の遺伝子の機能 (補体C4, C2, 21-OH, TNFなど)
- 7) その他のHLA領域内遺伝子の機能 (TAP, LMPなど)

IV. 免疫系と免疫応答の概要

- 1) 非特異的自然免疫と特異的獲得免疫
- * 2) 細胞性免疫と体液性免疫
- * 3) 抗原提示細胞、T細胞、B細胞、NK細胞、NKT細胞の機能
- * 4) 抗原提示におけるHLA分子の役割と抗原のプロセッシング
- 5) T細胞レパトワの形成におけるHLA (MHC) 分子の役割
 - i) T細胞レセプター遺伝子の再構成による多様性の獲得
 - ii) 胸腺におけるT細胞レパトワの選択とMHC拘束性の獲得
 - iii) 胸腺および末梢における免疫寛容の誘導
 - iv) T細胞が示すアロ反応性の機序

V. HLAの臨床応用

- * 1) HLAと移植
 - i) 臓器移植と拒絶反応
 - ii) 各種臓器移植の概要 (成績を含む)
 - iii) 組織、細胞移植
- * 2) HLAと輸血
- * 3) HLAと造血幹細胞移植 (骨髄・末梢血・臍帯血)
- * 4) 各種の臓器バンクとネットワークシステム
- 5) HLAと感染免疫、ワクチン
- 6) HLAと自己免疫疾患
- 7) HLAと腫瘍免疫
- 8) HLAと法医学
- 9) HLAと生殖免疫
- 10) その他
 - i) HLAに連鎖した遺伝性疾患
 - ii) HLAと非免疫関連疾患との関連
 - iii) HLAと老化

VI. 最先端医療とHLA

- 1) ペプチド療法
- 2) オーダーメイド医療
- 3) 再生再建医療
- 4) 遺伝子治療
- 5) 遺伝子診断
- 6) ゲノム創薬
- 7) 異種移植

【HLAタイピング技術に関する知識】

*I. HLAタイピング技術の歴史

*II. 血清学的に決定される (serologically defined ; SD) 抗原の同定

- 1) HLAクラスI, II抗原同定の原理
- 2) リンパ球分離法
- 3) HLAクラスI, II抗原の同定と判定
- 4) 抗血清の評価法
 - パネル細胞の組み方
 - セログラム解析法
- 5) 抗血清、補体の選択と問題点

III. リンパ球反応により決定される (lymphocyte-defined; LD) 抗原の同定

- 1) リンパ球混合培養反応 (mixed lymphocyte culture reaction; MLR) による解析
 - MLRの原理
 - MLR解析の実際
 - LD抗原の同定と判定
 - ホモ接合タイピング細胞 (homozygous typing cell; HTC) の収集と管理
- 2) 感作リンパ球試験 (primed lymphocyte test; PLT) による解析
- 3) 細胞媒介性リンパ球溶解反応 (cell-mediated lymphocytolysis; CML) による解析

*IV. HLA対立遺伝子 (アリル) の同定

- 1) DNAタイピング法の種類
- 2) DNAタイピング法の原理
 - PCR-RFLP法
 - PCR-SSOP法
 - PCR-SSP法
 - PCR-SBT法
 - PCR-SSCP法
 - RSCA法
 - その他
- 3) DNAタイピングの実際
 - DNAの抽出法
 - PCR法の原理
 - アリルの同定と判定
 - HLA遺伝子型と抗原型との関係
 - HLA遺伝子型の表記法
- 4) 種々のDNAタイピング法の特徴 (長所と短所)

V. HLA検査の臨床応用

*1) 移植

- 組織適合性検査
- パネル細胞を用いた前感作抗体検査
- 交差試験

LCT法、AHG-LCT法、Flow PRA法、DTT処理法

MLR法

マイナー組織適合性検査

移植後のモニタリング検査

2) 疾患感受性、抵抗性の解析

統計処理法

家系調査とハプロタイプ解析

B 認定制度における実技研修(案)について

実技研修の内容としては、概ね下記のような項目について数種類を選んだうえで、実技研修講師の指導のもとに行われる実習と、ビデオ等による研修を考慮中です。実技研修は、HLAタイピングや移植関連検査に関して、知っておかなければならない技術および知識の習得を目的に行われますが、その項目は教育部会により示された教育内容に準拠します。なお、具体的な研修内容の詳細については、今後、教育部会で十分に検討した後に決定し、これを公表します。

I. DNAタイピングの研修

1. DNAタイピングの実技

PCR-RFLP法

PCR-SSOP法

PCR-SSP法

PCR-SBT法

PCR-SSCP法

RSCA法

その他

2. アリルの同定と判定

3. トラブルシューティングと対処

II. 血清学および細胞学的検査法の研修

1. LCT法による抗原の同定

2. MLR法による抗原の同定

3. LCT法による交差試験

4. Flow PRA法

5. Flow 交差試験法による抗HLA抗体の検出

以上です。

訂 正

本誌前号(8巻3号)表紙およびContentsに掲載されました目次の記載に、誤りがありました。お詫びして訂正致します。

訂正部分 : [原著論文] Association between HLA class II genotypes and IgA nephropathy in Japanese patients.....Toshiki Hiratsuka, Hidetoshi Kaneoka, Ritsuya Noda, Satoru Ogahara, Toshiaki Murata, Isao Michinaga, Sigeo Takebayashi, Takao Saito and Setsuya Naito..... 187

Osaka Kidney Transplantation Forum 2002

Osaka Kidney Transplantation Forum 2002を下記の要領で開催致します。

本**Forum**には、日本全国およびアジア諸国より外科医（移植関係者）を中心に、この分野に関心を抱く多数の臨床医や研究者の参加が予定されており、移植に関する諸問題について、広く最先端の斬新なテーマを取り上げるとともに、これらの成果を集約して実地医療に反映し、さらに将来への展開をはかり、国民医療の向上およびアジア諸国の移植事業に寄与できる**Forum**にしたいと考えております。

皆様のご参加をお待ち致しております。

Osaka Kidney Transplantation Forum 2002

会長 園田 孝夫

会期 2002年(平成14年)11月1日(金) 15:00~19:00
11月2日(土) 9:00~15:00

会場 MIDシアター
大阪府中央区城見2-61-1
TEL. 06 (6947) 6839 (代表)

プログラム概要

1. Gene Transfer
2. Tolerance Induction
3. Xeno-Transplantation
4. Co-stimulatory Signal Blockage
5. Protocol Biopsy
6. Satellite Symposium - 2 sessions
7. Luncheon Seminar - 1 session

Invited guests(Plan)

Kathryn J. Wood , Kazuhiko Yamada , Volker Brinkmann ,
Stuart Knechtle , Man-Kay Li and Kim Solez

共催 財団法人 大阪腎臓バンク

フォーラムについての問い合わせ先：

大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学講座〈泌尿器科〉(高原史郎・山本典子)
〒565-0871 吹田市山田丘2-2
TEL. 06 (6879) 3531 FAX. 06 (6879) 3539
E-mail : oktf@uro.med.osaka-u.ac.jp

本フォーラムは、若手の研究者・臨床医の育成を目的としております。そのため、2日間の参加費は proceeding を含め当日参加7,000円、事前登録5,000円と低額に設定しています。また、講演は英語セッションと日本語セッションに分かれますが、発表内容はあらかじめ英文と日本語文での要旨と論文形式の proceeding を作成し、当日のディスカッションへの参加と理解を容易にするよう工夫しております。

＜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りますので、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。なお、掲載された論文等の著作権は、日本組織適合性学会に属し、インターネットを通じて電子配信されることがあります。

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。また、新対立遺伝子、日本人に認められた希な対立遺伝子に関する報告も受け付ける。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'NJ25' 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，页数による。

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

1991年秋、横浜で第11回国際組織適合性ワークショップ&カンファレンスが開かれた。このワークショップの準備の過程で、日本組織適合性学会の発足が起案され、それまでの日本組織適合性研究会を母体として1992年に本学会が設立された。あれから早や11年、日本組織適合性学会も学会大会が今年で第11回、学会誌MHCも9巻となり、さらに認定制度も加えて立派な学会へと成長した。学会発足前の研究会会員が約200名、研究会参加者が毎回50名程度であったのが、現在の学会員数437名、大会参加者200名程度と学会の規模も大きくなった。

しかし一方、学会の規模も制度も大きくなったけれど、はたして内容は本当に充実してきたのであろうか。本誌MHCに投稿される原著論文数は多いとは言えないし、大会の研究発表の数ももっと多くしたい。

今年2002年5月には第13回国際組織適合性ワークショップ&カンファレンスがカナダのVictoriaと米国のSeattleで開かれる。日本組織適合性学会を更に活性化させる一つの機会としたいものである。

大谷文雄

MHCバックナンバー

一冊¥2,000にて購入可能です。学会事務局までお問い合わせください。発行より2年を経過したものは、在庫が少数になっている場合もありますのでご了承下さい。

入会・変更

新入会、住所変更は学会事務センターまでお問い合わせください。また、日本組織適合性学会ホームページの入会申込書もご利用下さい。

(社) 学会事務センター

〒113-8622

東京都文京区本駒込5-16-9 学会センターC21

TEL : 03-5814-5810

FAX : 03-5814-5825

日本組織適合性学会ホームページ

学会活動に関する情報やHLA遺伝子の塩基配列情報が利用できます。

<http://square.umin.ac.jp/JSHI/mhc.html>

<http://jshi.umin.ac.jp/mhc.html>

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

2002年4月30日発行 9巻1号, 2002

定価 2,000円

発行 日本組織適合性学会(会長 猪子 英俊)

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)

〒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