

第6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6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⁾ 東京都赤十字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⁾ 長野県赤十字血液センター, 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⁾ 特定非営利活動法人HLA研究所, 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6回目の開催になるHLA-QCワークショップは、平成14年1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。昨年同様、ワークショップ参加は有料（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14年2月28日で77施設からの参加申込があった。3月末日に3種類の血液（2～3ml）と3種類のDNAサンプル（IHW reference cell）を参加者に送付した。前年度は、発送時に試験管の破損等があったため、今回はプラスチック製の試料ケースに入れて発送した。結果的に破損等の報告はなかった。平成14年5月31日までに76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。6月中に結果をコンピューター入力し、7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。

表1 第6回HLA-DNAタイピングQCワークショップ

平成14年1月	ワークショップ参加申込
2月末	申込締切り 76施設参加
3月末	サンプル配布（3血液, 3DNA）
5月31日	結果報告締切り 75施設報告
6月	結果データ入力
7月中旬	参加施設へ中間報告（入力確認）
8月	ワークショップ集会報告者依頼 データ解析
9月23日	第6回HLA-QCワークショップ集会

2. 参加者・参加施設

今回のワークショップ参加施設数は、施設参加として43施設（継続39, 新規4）、個人参加として33施設（1名参加26, 2名参加2, 3名参加5施設）、合計76施設であった（表2）。第1回から第5回ま

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6回HLA-QCワークショップ参加施設

施設・個人参加	継続	新規	総計
施設参加数	39	4	43
個人参加施設数	22	11	33
1名参加	16	10	26
2名参加	1	1	2
3名参加	5	0	5
総計	61	15	76

個人参加者数 33 12 45

での参加施設数は、順に37, 61, 63, 72, 65施設であり、昨年度は参加費が有料化されたためか一時的に参加施設数の減少が見られたが、本年度は認定技術者制度の発足も相まって、参加施設は一昨年以上に増加した。参加者としては、施設参加として141名、個人参加として45名の登録があり、合計186名の参加があった。

第6回までの地域別、施設形態別の参加施設数を表3に示す。これまで6年間に1回でも参加した施設は112施設で、施設形態の内訳としては、病院36施設(32%)、大学病院・血液センターは同数の23施設(20%)で、全体の70%以上を占めていた。地域別では、関東甲信越で45施設(40%)と最も

表3 第1～第6回HLA-QCワークショップ参加施設と地域

地域・施設分類	メーカー	血液センター	検査センター	大学・研究所	大学病院	病院	総計
北海道		1				1	2
東北	1	1			3	4	9
関東甲信越	10	6	3	6	10	10	45
東海北陸		4			3	3	10
近畿	2	4	1	2	4	3	16
中四国	1	3		2	2	9	17
九州沖縄		4	1	1	1	6	13
総計	14	23	5	11	23	36	112

(14輸血部)

表4 参加施設分類と参加回数

参加回数・施設分類	メーカー	血液センター	検査センター	大学・研究所	大学病院	病院	総計
1	4	4	1	1	6	5	21
2	2			3	2	10	17
3	6	5			2	5	18
4		4		2	7	5	18
5	1	4	1	1	2	8	17
6	1	6	3	4	4	3	21
総計	14	23	5	11	23	36	112

多く、その他の地域では、北海道を除き9～17施設(8～15%)であった。また、参加回数では、6回連続参加した施設は、21施設(18%)あり、施設形態別では血液センターの6施設(5%)が最も多かった。4回以上参加した施設数は、56施設でちょうど全体の半数であった(表4)。

3. まとめ

平成9年に開催された第1回QCワークショップへの参加施設は、わずか37施設であったのが、第6回ワークショップではほぼ倍の76施設が参加するようになった。この間、クラスIIタイピングは、2桁レベルのタイピングから4桁レベルのタイピングに移行し、また、当初クラスIタイピングの報告は皆無であった状況から今日では、参加施設の9割以上にあたる71施設からHLA-A, B アリルタイピングが実施されるようになった。こうして、クラスIIのみならず、クラスI抗原に関してもHLAタイピングの主座はDNAタイピングが占めるようになった。

また、ワークショップの運営に関して、学会主導の第3回以降は、全体報告の他に各キット別の生データの解析をできるだけ多くの参加者に報告してもらうように配慮した。その結果、各キットの長所・短所を含めた多くの情報を参加者が共有することができ、参加者間の円滑なコミュニケーションの向上にも資することができたと考えている。今後のワークショップのあり方に反映していただきたい。

その他に、いくつかの課題も残されている。当面の問題としては、現実の移植医療におけるドナー/レシピエントのマッチングシステムが血清型で行われており、DNAタイピングの結果報告が必ずしも現状の医療に則していないことがあげられる。これについては、HLA標準化委員会から「アリル表記法と結果報告の原則について2002」として指針をまとめるのでそれを参照していただきたい。第2点は、HLAタイピングが治療前検査であるならば、その

医療の結果からHLA検査結果ならびにマッチングシステムを再評価することである。これが行われてはじめて検査技術者は、HLAタイピング結果に対する責任感ならびに誇りが生まれることになるであろう。認定組織適合性指導者の責任ははなはだ重い。

参加施設

北海道赤十字血液センター 検査部検査三課, 鷹揚郷腎研究所弘前病院 臨床検査部HLA検査室, 岩手医科大学附属病院 中検生化学検査室, 仙台社会保険病院 研究部, 宮城県赤十字血液センター 検査課, 株式会社ゲノムサイエンス研究所 研究開発部, 福島県立医科大学医学部附属病院 輸血・移植免疫部, 新潟市民病院 中央検査部特殊検査室, 医療法人立川MC立川総合病院 検査科, 長野県赤十字血液センター 検査課, 信州大学医学部 法医学, 島田記念病院 検査科, 富士重工業健康保険組合総合太田病院 臨床検査科, 自治医科大学附属病院 輸血・細胞移植部, 有限会社ディーアールラボ, 埼玉医科大学総合医療センター 輸血・細胞治療部, (株)ピーエムエル 細胞形態学部細胞生物学課, 埼玉医科大学附属病院 中央検査部輸血検査室, 埼玉県赤十字血液センター 検査二課, 防衛医科大学校病院 検査部研究室, 国立佐倉病院 HLA検査室, 千葉県船橋赤十字血液センター 検査二課, 東京女子医科大学 腎センター移植免疫, (株)テイエフビー 技術部, 虎の門病院 輸血部, 株式会社ベリタス 技術営業部, 東京医科歯科大学難治疾患研究所 成人疾患研究部門分子病態分野, 東京都赤十字血液センター 検査三課, アプライドバイオシステムズジャパン株式会社 テクニカルサポート, 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野, (株)三菱化学ビーシーエル 検査第二部凝固細胞性免疫, 北里大学医学部 免疫学, 株式会社エスアールエル 遺伝子検査室, 横浜市立大学医学部附属病院 輸血部, 神奈川県赤十字血液センター 検査部検査一課, 東海大学医学部附属病院 細胞移植医療センター, 東海大学医学部 分子生命科学系遺伝情報部門, 名古屋第二赤十字病院 組織適合検査室, 静岡県立こども病院 臨床病理科, 静岡県立総合病

院 総合診療部血液管理室, 愛知県赤十字血液センター 検査二課, 三重県赤十字血液センター 検査課, 石川県赤十字血液センター 検査課, 金沢医科大学病院 北陸腎移植HLA検査センター, 富山医科薬科大学附属病院 輸血部, 富山県赤十字血液センター 製剤課品質管理係, 塩野義製薬(株)シオノギバイオメディカル大阪ラボラトリー 臨床検査部, シオノギ製薬(株)診断薬部 研究開発部門, 大阪市立大学医学部附属病院 輸血部, 大阪府立病院 臨床検査科組織適合検査室, 国立循環器病センター 臨床検査部輸血管理室, 大阪府赤十字血液センター 検査二課, 関西医科大学附属病院 輸血部, 京都府立医科大学附属病院 腎移植センター, 京大医学部附属病院 輸血部, 兵庫県赤十字血液センター 検査一課, 兵庫県立西宮病院 腎臓移植センター, 広島県赤十字血液センター 検査課, 湧永製薬株式会社 創薬研究所バイオ診断研究室, 山口県赤十字血液センター 検査課, 松江赤十字病院 輸血管理室, 岡山県赤十字血液センター 検査課, 国立病院岡山医療センター 輸血管理室, 香川県立中央病院 検査科血清検査室, 徳島大学医学部附属病院 輸血部, 高知県衛生研究所 保健科学部, 高知県立中央病院 癌研究所, 愛媛県立衛生環境研究所 疫学情報科, 福岡赤十字病院 臨床検査部HLA検査, 福岡大学病院 第四内科, 長崎県赤十字血液センター 検査課, 国立病院長崎医療センター 臨床検査科, 熊本県赤十字血液センター 検査課, 大分県立病院 中央検査部, 宮崎県立宮崎病院 輸血検査室, 沖縄県立中部病院 輸血検査 (76施設)

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⁾ 長野県赤十字血液センター, 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⁾ 東京都赤十字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⁾ 特定非営利活動法人HLA研究所, ¹⁰⁾ 鹿児島大学医学部ウイルス学

1. 参加施設

今回のHLA QCクラス I に参加した施設数は、A座71施設、B座71施設、C座44施設で、A座に18施設、B座に20施設、C座に6施設が新たに参加した。

2. 解析方法

データ解析に当たっては、昨年同様、Low resolution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た。orや/のついた回答で複数の抗原が含まれている場合(Cw*12/13/15等)は不一致としたが、A*23/A*24, A*01/*A36, B*54/B*55については、Low resolutionにあたらなると考え、一致率の解析から除外した。一方、血清学表記での回答(B61, B62等)は一致とした。High resolutionの一致はコンセンサスと完全一致であることとし、4桁表示が2桁レベルで間違っている回答はLow resolution解析の対象とし、High resolution解析の対象外とした。明らかに記入ミスによると考えられた回答については、確認後訂正した。

3. 結果および考察

1) HLAクラス I 遺伝子型の一致率

今回配布された6種類のDNAサンプルのコンセンサスHLAクラス I 遺伝子型を表1に示し、それぞれの遺伝子型の一致率を表2—表4に示す。コンセンサスの5桁目以降の報告数は最小のB*40011の1施設から最大のA*01011の5施設と少なかったが、1施設のみ報告のB*40011を除き報告された全てのデータが一致していたことから参考データとして掲載する。

今回のHLA-A遺伝子型は日本人集団に一般的に見ることのできるアリルであったため、Low resolutionでは大変高い一致率であった。不一致回答は、A*26, A*24をblankとした回答がそれぞれ1, A*24をA*11とした回答が1であった。また、同じメーカーのキットを使用していた3施設がA*01とA*36およびA*24とA*23の識別ができなかった。High resolutionにおいても、A*2402以外100%の一致率であった。

HLA-B遺伝子型には、日本人ではほとんど見る

表1 平成14年度QCWSのHLAクラス I 遺伝子型 (コンセンサス)

	H1401		H1402		H1403		H1404		H1405		H1406	
HLA-A*	02011	2601	01011	2601	2402 101	2601	2402 101	3303	0206	2402 101	02011	3303
HLA-B*	1517	3801	2705	40011	5401	4002	44031	5401	52011	4601	15011	15011
HLA-Cw*	0701	12031	0202	03041	0102	03041	0102	1403	0102	1202	0303	1502

表2 HLA-A 遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			High resolution		
	報告数	一致数	一致率	報告数	一致数	一致率
A*0101	68	68	100.0	27	27	100.0
A*0201	141	141	100.0	43	43	100.0
A*0206	70	70	100.0	23	23	100.0
A*2601	213	212	99.5	65	60	92.3
A*2402	201	199	99.0	52	50	96.2
A*3303	139	139	100.0	39	39	100.0
計	832	829	99.6	249	242	97.2

表3 HLA-B 遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			High resolution		
	報告数	一致数	一致率	報告数	一致数	一致率
B*1501	140	138	98.6	46	44	95.7
B*1517	71	71	100.0	60	59	98.3
B*2705	71	71	100.0	15	12	80.0
B*3801	71	66	93.0	38	37	97.4
B*4001	71	71	100.0	32	32	100.0
B*4002	71	71	100.0	37	36	97.3
B*4403	70	70	100.0	30	30	100.0
B*4601	70	70	100.0	41	41	100.0
B*5201	70	70	100.0	55	54	98.2
B*5401	137	137	100.0	105	104	99.0
計	842	835	99.2	459	449	97.8

表4 HLA-C 遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			High resolution		
	報告数	一致数	一致率	報告数	一致数	一致率
Cw*0102	130	129	99.2	61	60	98.4
Cw*0202	43	43	100.0	23	23	100.0
Cw*0303	44	44	100.0	20	20	100.0
Cw*0304	86	86	100.0	29	27	93.1
Cw*0701	44	44	100.0	11	9	81.8
Cw*1202	43	43	100.0	29	29	100.0
Cw*1203	44	44	100.0	13	13	100.0
Cw*1403	44	44	100.0	34	34	100.0
Cw*1502	44	41	93.2	10	10	100.0
C座 計	522	518	99.2	230	225	97.8

ことのないB*1517, B*3801が含まれたいた。Low resolution においてB*1517は100%の一致率であったが、B*3801は3施設において検出ができなかった。この3施設はHLA-AのLow resolutionでA*01とA*36およびA*24とA*23を識別できなかったメーカーのキットを使用していた。また、B*1501をB75, B44とタイプした施設がそれぞれ1施設あり、54, 55を識別できなかった施設が3施設あった。High resolution においては、B*4001, B*4403, B*4601の一致率が100%であった他、B*2705を除きいずれのアリルも95%以上の一致率であった。B*27のアリルタイピングは疾患との関係から早くよりタイピングキットも開発されているにもかかわらず、報告数も少なく一致率も低かった。HLA-CのLow resolutionでは、Cw*15が検出できなかった施設が3施設、Cw*01をCw*12と報告した施設が1施設あった以外は100%の一致率であった。High

表5 クラス DNAタイピングの方法

方法	N	%	キット名	N
SSO	49	69.0	Reli	24
			MPH	13
			塩野義	9
			SPP	7
			Inolipa	1
SSP	41	57.7	Micro-SSP	23
			Unitray	7
			Dynal-SSP	5
SBT	10	14.1	ABI	8
			Genekit	3
			AlleleSEQR	1
SSCP	6	8.5		
RFLP	3	4.2		
RSCA	2	2.8	PeI-RSCA	2

表6 方法別一致率

方 法	施設数 (N)	使用比 率(%)	Low resolution			High resolution		
			報告数	一致数	一致率	報告数	一致数	一致率
SSO	24	33.8	604	599	99.2	145	142	97.9
SSP	16	22.5	551	543	98.5	100	95	95.0
SBT	2	2.8	49	49	100.0	18	16	88.9
1法使用合計	42	59.2	1204	1191	98.9	263	253	96.2
SSO+SSP	14	19.7	453	452	99.8	258	252	97.7
SSP+SBT	3	4.2	107	107	100.0	83	83	100.0
SSO+SBT	1	1.4	36	36	100.0	36	36	100.0
SSP+RSCA	1	1.4	36	36	100.0	12	9	75.0
2法併用合計	19	26.8	632	631	99.8	389	380	97.7
SSO+SSP+SSCP	2	2.8	72	72	100.0	38	38	100.0
SSO+SSP+RFLP	2	2.8	72	72	100.0	72	69	95.8
SSO+SBT+SSCP	1	1.4	36	36	100.0	19	19	100.0
SSO+SBT+RSCA	1	1.4	36	36	100.0	36	36	100.0
SSO+SBT+RFLP	1	1.4	36	36	100.0	33	33	100.0
3法併用合計	7	9.9	252	252	100.0	198	195	98.5
SSO+SSP+SBT+SSCP	2	2.8	72	72	100.0	52	52	100.0
SSO+SSP+SBT+SSCP+RFLP	1	1.4	36	36	100.0	36	36	100.0
計	71	100.0	2196	2182	99.4	938	916	97.7

resolution においても Cw*0102をCw*0105と回答した施設が1施設、Cw*0304を他のCw*03アリアル、Cw*0701を他のCw*07とした施設がそれぞれ2施設ずつあった他は100%の一致率であった。

2) 方法別・使用キット別一致率

今回参加した施設が使用したタイピング方法とキットの種類を表5に示し、方法別一致率

表7 Low resolution におけるキット別不一致数 (SBT除く)

Kit-1	Kit-2	施設数	A	B	C
Reli	単独	14	0	0	0
	Micro-SSP	4	0	0	0
	Dynal-SSP	3	0	0	0
	SPP	1	0	0	0
	Unitray	1	0	1	0
	塩野義	1	0	2	0
Micro-SSP	単独	11	3	1	3
	MPH	2	0	0	0
	SPP	1	0	1	0
	Unitray	1	0	0	0
	RSCA	1	0	0	0
	Dynal+Inolipa+MPH	1	0	0	0
塩野義	単独	7	0	0	0
	MPH+SPP	1	0	0	0
MPH	単独	5	0	0	0
	SPP	1	0	0	0
Unitray	単独	3	0	0	1
	SPP	1	0	0	0
SPP	単独	2	0	2	0
Dynal-SSP	単独	1	0	0	0

を表6に示す。

1方法のみ使用している施設は42施設(59.2%)あり、24施設がSSOのみ使用、16施設がSSPのみを実施していた。2施設がSBTのみを実施していた。Low resolutionの一致率において、SSO、SSPのみ使用した施設と、これら2法を併用した施設にのみ不一致が存在した。それ以外の方法の組み合わせにおいて不一致は一例もなかった。High resolutionにおいて、2法以上の方法を使用した施設で、SBTも実施した施設では100%の一致率であった。SSO、SSPの2法、SSO、SSP、RFLPの3法を使用した施設で不一致が認められた。

使用キット別Low resolution不一致数を表7に示す。キットの品質上に問題があると考えられたのはSPPのみで、その他のキットはいずれも品質に差はないと考えられた。

3) 施設分類別・参加回数別一致率

施設分類別一致率を表8に示す。Low resolutionにおいて施設分類による大きな差はなかった。研究機関においては100%の一致率であった。High resolutionの回答率では、研究機関が66%と最も高く、ついで検査センター・メーカーの59%、血液セン

ターの45%、大学付属病院の35%、病院の27%の順であった。血液センターにおいて、High resolutionの回答率が病院より高いのは、そのタイピング目的が骨髄移植のためからと考えられる。研究機関、検査センター・メーカー、血液センターの一致率は99%と高いものであった。

QCワークショップ参加回数別一致率を表9に示す。参加回数が多い施設でのLow resolution, High resolutionの一致率が高い。また、High resolutionの回答数も参加回数の多い施設で多くなっていた。

まとめ

今回のQCにおいて、一部のキットを除きその精

度に問題がないことが証明された。精度に問題が残ったキットについては、早期の改良を望む。同じキットを使用していても同じ結果がでない施設が存在し、これらについてはキット販売メーカーによる徹底した指導が必要と思われる。また、7施設が血清学に置き換えた回答をしたが、QCWSが行われた時点ではDNAタイピングの結果を血清学タイプに戻さないことになっていた。これら回答を出した施設のなかに、HLA認定技術者のいる施設が2施設、HLA認定指導者のいる施設が1施設あったことは問題である。

表8 施設別一致率

施設内訳	施設数	Low resolution			High resolution			
		回答数	2桁間違い	%	回答数	回答率	4桁間違い	%
病 院	22	636	628	98.7	175	27.5	168	96.0
血 液 セ ン タ ー	17	556	554	99.6	255	45.9	252	98.8
大 学 附 属 病 院	14	432	429	99.3	152	35.2	143	94.1
検 査 セ ン タ ー ・ メ ー カ ー	10	320	319	99.7	191	59.7	189	99.0
研 究 機 関	8	252	252	100.0	165	65.5	164	99.4
計	71	2196	2182	99.4	938	42.7	916	97.7

表9 参加回数別一致率

参加回数	施設数	Low resolution			High resolution			
		回答数	一致数	一致率	回答数	回答率	一致数	一致率
1	23	678	668	98.5	148	21.8	138	93.2
2	15	458	454	99.1	171	37.3	163	95.3
3	13	384	384	100.0	160	41.7	158	98.8
4	20	676	676	100.0	459	67.9	457	99.6
計	71	2196	2182	99.4	938	42.7	916	97.7

クラスIIタイピングの評価

橋本光男¹⁾, 斉藤 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⁾ 長野県赤十字血液センター, ³⁾ 福岡大学医学部第4内科, ⁴⁾ 東京都赤十字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

今回のクラスIIタイピングQCWSの参加施設は75施設(無回答:1施設)であった。その内訳は、新規参加が15施設(施設参加:4施設, 個人参加:11施設)で、60施設(施設参加:39施設, 個人参加:21施設)が継続参加であった。クラスII遺伝子座毎の参加内訳は、DRB1アレルが75施設, DRB3, DRB4アレルについては、それぞれ43, 42施設であった。DQA1, DQB1, DPB1アレルはそれぞれ、13, 47, 14施設で、例年に比べてDRB1遺伝子型のみでの参加が増えている傾向が認められた(表1)。

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)	第6回(2002)
	施設数 (%)					
DRB1						
Low	4 (11.1)	8 (14.8)	13 (21.3)	19 (28.4)	15 (23.4)	15 (20.0)
Middle	0 (0)	2 (3.7)	2 (3.3)	6 (9.0)	12 (18.8)	14 (18.7)
High	32 (88.9)	44 (81.5)	46 (75.4)	42 (62.7)	37 (57.8)	46 (61.3)
計	36	54	61	67	64	75
DRB3						
Low	3 (18.8)	4 (13.3)	16 (44.4)	12 (30.0)	16 (41.0)	7 (16.3)
Middle	1 (6.3)	0 (0)	4 (11.1)	4 (10.0)	9 (23.1)	17 (39.5)
High	12 (75.0)	26 (86.7)	16 (44.4)	24 (60.0)	14 (35.9)	19 (44.2)
計	16	30	36	40	39	43
DRB4						
Low	10 (62.5)	19 (67.9)	22 (71.0)	28 (71.8)	24 (61.5)	18 (42.9)
Middle	0 (0)	4 (14.3)	5 (16.1)	2 (5.1)	7 (17.9)	4 (30.8)
High	6 (37.5)	5 (17.9)	4 (12.9)	9 (23.1)	8 (20.5)	9 (21.4)
計	16	28	31	39	39	42
DQA1						
Low	3 (27.3)	3 (33.3)	4 (36.4)	3 (21.4)	1 (7.7)	1 (7.7)
Middle	0 (0)	0 (0)	2 (18.2)	2 (14.3)	4 (30.8)	4 (30.8)
High	8 (72.7)	6 (66.7)	5 (45.5)	9 (64.3)	8 (61.5)	8 (61.5)
計	11	9	11	14	13	13
DQB1						
Low	0 (0)	3 (9.4)	8 (22.2)	14 (32.6)	8 (18.6)	5 (10.6)
Middle	0 (0)	0 (0)	2 (5.6)	4 (9.3)	11 (25.6)	17 (36.2)
High	29 (100)	29 (90.6)	26 (72.2)	25 (58.1)	24 (55.8)	25 (53.2)
計	29	32	36	43	43	47
DPB1						
Low	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Middle	1 (5.9)	0 (0)	2 (11.1)	0 (0)	1 (6.7)	1 (7.1)
High	16 (94.1)	21 (100)	16 (88.9)	20 (100)	14 (93.3)	13 (92.9)
計	17	21	18	20	15	14

2. タイピング方法と異なる方法の併用

HLA-DR, DQ, DPタイピングに用いられたタイピング方法を表(2)に示した。DRタイピングにはPCR-SSOP法(35.6%)とPCR-SSP法(33.9%)が用いられ、DQ, DPタイピングには各々、PCR-SSP法(49.2%), PCR-RFLP法(61.9%)が採用されている。それぞれの施設が遺伝子座ごとに異なった方法を用いてタイピングを行っていると考えられる。この傾向は前回のWSから認められ、今回も同様の結果が得られた。一方、クラスIIタイピングと異なる方法の併用数については表(3)に示した。DRタイピングは、2種類以上の方法で実施している施設は31施設であるのに対し、1種類のみでタイピングを行っている施設は、参加施設の約半数に相当する38施設であった。前回のWSでは、参加施設の70%弱が2種類以上の方法で実施していたが、今回のWSでは1種類の方法でタイピングを実施している施設が増加しているのが特徴であった。DQ, DPタイピングについては、前回のWSに比較して2種類の方法を併用している施設が増加している傾向がみられた(DQタイピング:44.7%, DPタイピング:57.1%)。タイピング方法の組み合わせは、DRタイピングには、PCR-SSO法或いはPCR-SSP法を主体にPCR-RFLP法, PCR-SSCP法を併用していた。DQタイピングは、PCR-SSP法を主体にPCR-RFLP法或いはPCR-SSO法を組み合わせでタイピングを行い、DPタイピングは、PCR-RFLP法を主体に他の方法を併用しているのが特徴であった(表4)。

表2 クラス II タイピング方法

locus\method	SSOP (%)	SSP (%)	RFLP (%)	SBT (%)	SSCP (%)	RSCA (%)	PHFA (%)
DR	42 (35.6)	40 (33.9)	16 (13.6)	9 (7.6)	10 (8.5)	1 (0.8)	0 (0)
DQ	12 (19.0)	31 (49.2)	16 (25.4)	1 (1.6)	3 (4.8)	0 (0)	0 (0)
DP	0 (0)	3 (9.5)	14 (61.9)	1 (14.3)	2 (4.8)	0 (0)	1 (4.8)

表3 異なる方法の併用

(2002年)

遺伝子座	4種類 (%)	3種類 (%)	2種類 (%)	1種類 (%)	計
DR	2 (2.7)	12 (14.7)	17 (22.7)	38 (50.7)	75
DQ	0 (0)	0 (0)	21 (44.7)	26 (55.3)	47
DP	0 (0)	0 (0)	8 (57.1)	6 (42.9)	14

(2001年)

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				
方法(1)	方法(2)	方法(3)	施設数 (%)	High (%)
SSO	SSP	RFLP	3 (21.4)	2 (20.0)
SSO	SSP	SSCP	2 (14.3)	2 (20.0)
SSO	RFLP	SSCP	2 (14.3)	2 (20.0)
計			14	10
SSP	SSO		9 (52.9)	3 (23.1)
SSP	RFLP		4 (23.5)	3 (23.1)
計			17	13
SSO			19 (50.0)	3 (42.9)
SSP			19 (50.0)	4 (57.1)
計			38	7

DQ			
方法(1)	方法(2)	施設数 (%)	High (%)
SSP	RFLP	9 (42.9)	9 (52.9)
SSP	SSO	7 (33.3)	4 (23.5)
RFLP	SSCP	2 (9.5)	2 (11.8)
計		21	17
SSP		20(76.9)	3 (60.0)
RFLP		3 (11.5)	1 (20.0)
SSO		3 (11.5)	1 (20.0)
計		26	5

DP			
方法(1)	方法(2)	施設数 (%)	High (%)
RFLP	SSP	4 (50.0)	4 (50.0)
RFLP	SSCP	2 (25.0)	2 (25.0)
RFLP	SBT	1 (12.5)	1 (12.5)
RFLP	PHFA	1 (12.5)	1 (12.5)
計		8	8
RFLP		6 (100)	5 (100)
計		6	5

表5 平成14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)
H1401	*01021	*12021	3*0301		*0101	*0601	*0301	*0501	*0201	*0301
H1402	*0404	-	4*0103		*0301	-	*0302	-	*0201	*1401
H1403	*04051	*1106	3*0202	4*0103	*0303	*0505	*0301	*0401	*0501	-
H1404	*04051	*13021	3*0301	4*0103	*0102	*0303	*0401	*0604	*0401	*0501
H1405	*08032	*09012	4*0103		*0103	*0302	*0303	*0601	*0201	*0501
H1406	*04051	*0406	4*0103		*0301	*0303	*0302	*0401	*0201	*0501

注) SBT等により2施設以上で一致して確認されたアレルについては5桁表示をした。

3. 第6回QCWS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に示した。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H1401, H1402及びH1403は培養細胞由来のDNA

サンプルで、それぞれDRB1*0102, DRB1*0404, DRB1*1106と日本人集団には稀少な遺伝子型である。特に、H1402はDRB1*0404のホモ接合と考えられる。他の3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いる。詳細については前々回の第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

表6 DRB1遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total	others	
	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*0102	75	75	100	20	14	70.0	36	34	94.4	88.1	0101/04/05	
DRB1*1202	75	75	100	15	15	100	45	45	100	100		
DRB1*0404	75	74	98.7	20	18	90.0	39	39	100	96.2	0405/06/09/+	0403/06/07/+
DRB1*0405	223	223	100	66	65	98.5	111	110	99.1	99.2	0415	
DRB1*0406	(74)	(74)	(100)	25	18	72.0	33	33	100	86.0	0404/08/19/+	
DRB1*1106	75	74	98.7	13	12	92.3	47	42	89.4	93.4	1101, 1104, 1344	1104/25/35
DRB1*1302	74	73	98.6	23	22	95.7	36	35	97.2	97.2	13/14, 1315	1301/1416/+
DRB1*0803	73	72	98.6	21	21	100	37	36	97.3	98.6	blank	
DRB1*0901	73	73	100	0			73	72	98.6	99.3	0902	
計	743	739	99.3	203	185	89.8	457	446	97.3	95.3		

表7 DRB3/4 遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total	others	
	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*0202	43	39	90.7	17	15	88.2	16	15	93.8	90.9	01, 0208	0101/02/03/+
DRB3*0301	86	77	89.5	32	27	84.4	37	37	100	91.3	01, 0101/02/03/+	0201/02/03/+
DRB4*0103	162	148	91.4	59	53	89.8	31	31	100	93.7	01/02/03/+	0101/02/15/+
計	291	264	90.5	108	95	87.5	84	83	97.9	92.0		

その対応抗原2000」を参考にして頂きたい。

4. HLA-DRB1遺伝子型の一一致率

今回のDRB1遺伝子型は日本人集団に一般的な6種類とDRB1*01, DRB1*04及びDRB1*11のそれぞれの稀少アリルであるDRB1*0102, DRB1*0404, DRB1*1106の計9種類である(表6)。9種類のDRB1遺伝子型のうちDRB1*0102, *0405, *0406, *0901, *1202の5種類のアリルのLow resolutionは100%の一一致率であったが、残りの4種類についてはそれぞれ1例ずつのアサインミスがみられた(DRB1*04をDRB1*01, DRB1*11をDRB1*13, DRB1*13をDRB1*13/14, DRB1*08を空白)。High resolutionレベルでは、稀少アリルのDRB1*0102, *1106の一一致率が他のアリルのそれに比べて低く、それぞれ94.4%, 89.4%であった(DRB1*0102をDRB1*0101, DRB1*1106をDRB1*1104)。DRB1*0404, DRB1*0406, DRB1*1202の3種類のアリルは100%の一一致率であったが、日本人集団に一般的にみられるDRB1*0901をDRB1*0902, DRB1*1302を

DRB1*1315といった稀有アリルで報告した施設がみられた。同様の傾向がMiddle resolutionでも認められ、3種類の稀少アリルであるDRB1*0102, DRB1*0404, DRB1*1106の一一致率が低く、それぞれ70.0%, 90.0%, 92.3%であった。特にDRB1*0102については、DRB1*0101/0105或いはDRB1*0101/04/05と報告した施設がみられることから使用キットに問題があると考えられた。他で一一致率が低かったアリルは、H1406のDRB1*0405, *0406のDRB1*04ヘテロ接合のサンプルで、DRB1*0405/10, -, 或いはDRB1*0405/10/28/+, -とタイプされ、DRB1*0406を空白と報告せざるを得なかったと考えられた。Low, Middle及びHigh resolutionタイピングの一一致率は、99.3%, 92.4%, 98.0%と稀少アリルが含まれていたにもかかわらず良好な結果が得られた。

5. DRB3/4遺伝子型の一一致率

今回配付されたサンプルのDRB3/4遺伝子型は、DRB3*0202, DRB3*0301とDRB4*0103, の3種類である(表7)。Low, Middle及びHigh resolution

表8 DQB1遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total	others
	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	93	93	100	34	34	100	49	48	96.0	98.7	0303
DQB1*0302	93	93	100	35	35	100	48	48	100	100	
DQB1*0303	47	47	100	14	14	100	28	28	100	100	
DQB1*0401	93	93	100	27	27	100	54	54	100	100	
DQB1*0402	47	47	100	14	14	100	27	27	100	100	
DQB1*0501	47	47	100	12	12	100	27	27	100	100	
DQB1*0601	47	46	97.9	11	11	100	28	28	100	99.3	blank
DQB1*0604	47	47	100	14	14	100	23	23	100	100	
計	420	419	99.7	136	136	100	233	232	99.3	99.8	

表9 DQA1遺伝子型一致率

遺伝子型	Low resolution			Middle resolution			High resolution			Total	others
	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	4	4	100	8	8	100	100	
DQA1*0102	13	13	100	3	3	100	10	10	100	100	
DQA1*0103	13	13	100	0			13	12	92.3	96.2	0102
DQA1*0301	26	25	96.2	4	4	100	15	14	93.3	96.5	0103
DQA1*0302	13	13	100	2	2	100	8	8	100	100	
DQA1*0303	39	39	100	6	6	100	24	23	95.8	98.6	0301
DQA1*0505	13	13	100	3	3	100	7	7	100	100	
DQA1*0601	13	13	100	0			13	13	100	100	
計	130	129	99.5	22	22	100	85	82	97.4	98.8	

タイピングのなかで、最も高い一致率が得られたのはHigh resolutionタイピングであった。ミスアサインは、サンプルH1403のDRB3*0202をDRB3*0208と報告した1例のみで、97.9%の一致率が得られた。Low及びMiddle resolutionタイピングは、それぞれ90.5%、87.5%と前回のQCWSとほぼ同じ結果であった(Low:85.3%、Middle:92.0%)。特に、Low resolutionレベルではDRB1遺伝子型の確認試験という意味合いが強く、DRB3或いはDRB4遺伝子型が陽性であるといった報告が多くみられた。全体としては92.0%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遺伝子型の一一致率

今回のDQB1遺伝子型は、DQB1*0301、*0302、*0401、*0402、*0501、*0601、*0604の7種類で日本人集団に一般的にみられる遺伝子型である。

Low、Middle及びHigh resolutionタイピングは、それぞれ99.7%、100%、99.3%と高い一致率が得られた(表8)。ミスアサインは、Low resolutionレベルでDQB1*06を空白に、High resolutionでDQB1*0303を*0301と報告した2例のみであったが、DRB1とDQB1遺伝子型のハプロタイプを考慮するとこのようなミスタイプを防ぐことができると思われる。今回のDQA1遺伝子型は、DQA1*0101、*0102、*0103、*0301、*0302、*0303、*0505、*0601の8種類である(表9)。

今回のDQA1タイピングは、Low resolutionレベルで1例(DQA1*03を*01)、High resolutionレベルで3例(DQA1*0103を0102、DQA1*0301を*0103、DQA1*0303を*0301)のミスアサインであった。これらのミスアサインは、技術的或いは表記ミスが原因と考えられる。DQA1タイピングで問題となっていたDQA1*0505に関しては、全ての参加施設で一致がみられた。

表10 DPB1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*0201	56	56	100	4	4	100	52	52	100	100
DPB1*0301	14	14	100	1	1	100	13	13	100	100
DPB1*0401	14	14	100	1	1	100	13	13	100	100
DPB1*0501	56	56	100	4	4	100	52	52	100	100
DPB1*1401	14	14	100	0			14	14	100	100
計	154	154	100	10	10	100	144	144	100	100

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
4種類	2	2.7	12	12	100	5	5	100	17	17	100	100▲
3種類	12	16.0	132	132	100	5	5	100	113	112	99.1	99.7
2種類	17	22.7	187	187	100	25	23	92.0	135	135	100	97.3
1種類	44	58.7▼	484	467	96.5	149	140	94.0	180	173	96.1	95.5
計	75											

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
2種類	21	44.7	231	231	100	23	22	95.7	207	205	99.0	98.2
1種類	26	55.3	286	286	100	94	92	98	165	165	100	99.3
計	47											

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
2種類	8	57.1	88	88	100	0			88	88	100	100
1種類	6	42.9	66	66	100	10	10	100	56	56	100	100
計	14											

7. DPB1遺伝子型の一一致率

今回送付したDPB1遺伝子型は、DPB1*0201、*0301、*0401、*0501、1401の5種類である(表10)。これらは今までのWSで送付された既知の遺伝子型であるので、全ての施設のコンセンサスが得られ100%の一一致率であった。

8. 異なる方法の併用と一致率

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)。DRB1タイピングは、1種類の方法で実施している施設が全体の58.7%に相当する44施設と増加しているのが今回のWSの特徴である。しかし、Low、Middle、High resolutionタイピング全体としては、1種類では95.5%、2種類で97.3%、3種類で99.7%、4種類の方法を併用した施設は100%の一

致率であった。特に、3種類以上の方法を併用している施設でのミスアサインは、130例の報告のうち1例のみで非常に高い一致率が得られている。一方、DQB1、DPB1タイピングに関しては、併用数が1種類と2種類のみでの実施であったが、両者の間で一致率の相違は認められなかった。結論としては、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、特にDRB1タイピングに関しては、複数の方法を併用するほうがより精度の高いタイピング結果を得ることができると言えよう。

9. 一致率の低かったHLAクラスII遺伝子型

今回のQCWSで一致率の低かった3種類の遺伝子型を表12に示した。これらは日本人集団には稀少な遺伝子型で、今回始めて送付された遺伝子型であ

表12 一致率の低い遺伝子型

alleles	sample No.	Low (%)	Middle (%)	High (%)	miss assign
DRB1*0102	H1401	100	70.0	94.4	DRB1*0101, DRB1*0101/04/05
DRB1*0404	H1402	98.7	90.0	100	DRB1*01, DRB1*(0405/06/09/+, 0403/06/07/+)
DRB1*1106	H1403	98.7	92.3	89.4	DRB1*(1101, 1104, 1344), DRB1*1104/25/35

遺伝子型	コドン78	コドン85	コドン86
DRB1*0101	TAC(Tyr)	GTT(Val)	GGT(Gly)
DRB1*0102	TAT(Tyr)	GCT(Ala)	GTG(Val)

遺伝子型	コドン74
DRB1*0403	GAG(Glu)
DRB1*0404	GCG(Ala)

遺伝子型	コドン85	コドン86
DRB1*1101	GTT(Val)	GGT(Gly)
DRB1*1106	GCT(Ala)	GTG(Val)

表13 クラスII遺伝子型一致率の推移

遺伝子型	第3回(1999)				第4回(2000)				第5回(2001)				第6回(2002)			
	Lab No.	Low(%)	Middle(%)	High(%)	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	75	99.3	92.4	98.0
DRB3/4/5	36	90.8	100	99.4	40	100	92.3	91.6	39	85.3	92.0	99.5	43	90.5	87.5	97.9
DQA1	11	98.5	100	97.0	14	100	94.7	95.7	13	100	94.3	100	13	99.5	100	97.4
DQB1	36	98.6	100	98.5	43	100	90.1	88.4	43	99.6	98.0	99.4	47	100	100	99.3
DPB1	18	97.7	90.0	99.0	20	94.8		94.8	15	99.7	100	99.8	14	100	100	100
計		97.0	98.0	98.6		98.9	93.9	93.9		96.7	96.1	98.9		97.9	96.0	98.5

る。DRB1*0102, *0404, *1106とそれぞれの既知の遺伝子型との変異は、表12に示すようにコドン74, 78, 85, 86の超可変部領域内での変異である。年々、新しい遺伝子型が見出され公認されている現状を考慮すると、High resolutionレベルでのタイピングはその度にプローブやプライマーを追加しなければならないが、少なくともLow或いはMiddleタイピングに関しては、特徴的な遺伝的多型性を示す複数の領域を網羅したプローブやプライマー等を組み入れて、ミスアサインを防ぐ必要がある。

10. まとめ

今回のQCWSのクラスIIタイピングに75施設が参加し、そのうち15施設が新規参加であった。今回のQCWSにおいて二つの特徴的な傾向が認められた。一つは、DRB1遺伝子型タイピングのみの参加が増えてきたことである。二つめの特徴としては、1種類の方法でタイピングを実施している施設が増

えていることである。深刻な経済不況が医療の現場にも反映して、試薬等の経費を節約せざるを得なくなってきたと考えられるが、タイピング従事者が既にDNAタイピング技術を習熟し、それぞれの施設に適した方法で日常業務を行っている結果を反映しているのであろう。しかし、DRB1タイピングの一致率は、1種類の方法でタイピングを実施している施設よりも、異なる方法で複数のキットを併用している施設の方が高い一致率を示している(表11)。

血清学的方法でHLAタイピングを行う場合、1種類の抗血清で判定するよりも、ロットの異なる複数の抗血清を用いてタイピングを行うほうが正確且つ精度の高い結果が得られると言われてきた。たとえ1種類の方法でDNAタイピングを行うにしても、特徴的な遺伝的多型性を示す複数の領域を網羅したプローブやプライマー等を組み入れることにより、ミスアサインを防ぐことができると考えられる。表13にHLA標準化委員会が主催してきた過去4年の遺

伝子座毎の一致率を示した。前年度より細胞株由来のDNAサンプルが配布され、日本人集団に稀少な遺伝子型が含まれるようになってきた。それ故、前回のDRB1遺伝子型タイピングの一致率は低下していたが、今回の結果は、参加施設が過去最大の75施設に増えているにも関わらず、前々回にほぼ匹敵する一致率が得られている。今回のDRB1タイピングのミスアサインは23例で、そのうちの78%にあたる18例は、日本人集団に稀少な遺伝子型が含まれているH1401からH1403の細胞株由来のDNAサンプルであった。従って、日本人集団に一般的な遺伝子型に関して、今回のQCWSに参加した全施設のタイピングクオリティは、非常に高いと判断できる。

HLA-DRB1タイピングは日常業務として定着して、正確なHLAタイピングを行っていると思われる。表記ミス等の初歩的なミスや、判定後に他のクラスII遺伝子型との連鎖を確認することさえ気をつけられればであるが。

この4年間、HLA標準化委員会のメンバーの一員としてクラスIIタイピングの精度管理に携わってきましたが、拙い解析能力で参加施設の会員諸氏に大変ご迷惑をおかけしましたことを深謝し、共にQCWSに参加できたことを喜びとします。本ワークショップの更なる発展を期待します。

アレル表記法と結果報告の原則について2002

木村彰方¹⁾、柏瀬貢一²⁾、徳永勝士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⁾ 東京都赤十字血液センター検査三課, ³⁾ 東京大学大学院人類遺伝学, ⁴⁾ 福岡大学医学部第4内科, ⁵⁾ 長野県赤十字血液センター, 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⁾ 特定非営利活動法人HLA研究所, ⁹⁾ 鹿児島大学医学部ウィルス学, ¹⁰⁾ 埼玉医科大学総合医療センター輸血・細胞治療部

HLAタイピングでは、血清学タイピング手法に加えて種々の原理に基づくDNAタイピングが用いられている。特に最近では、抗血清収集の困難さやタイピング精度の問題から、DNAタイピング手法がより一層普及し、タイピング目的によっては、血清学タイピングが行われないこともある。また、DNAタイピングの結果を用いて、臓器移植ペアの選択等が行われることも一般化しつつある。

日本組織適合性学会標準化委員会では「アレル表記法と結果報告の原則について2000」において、HLAタイピング結果の報告に関する提言を行った。

その中には、「2. DNAあるいは血清学的タイピングの結果欄に、血清学分類に書き替えた血清型を報告すべきではない」と、「3. 血清学的分類との対応が重要である場合（例えば臨床医への報告など）には、血清型との対応について、コメントあるいは説明の欄を設けて、追加説明することを推奨する」の提言が含まれるが、このようなDNAタイピングの結果のみでHLA型の判定が行われることが一般化している現状に鑑みて、「アレル表記法と結果報告の原則2000」に以下のことを付け加えることを提案する。

I. 結果報告について

1. DNAタイピングを行った場合には、原則としてDNA型を報告することとするが、それに加えて、DNAタイピングの結果から推定される血清型を「血清対応型」として報告することを可とする。

例1：HLA-Bローカスの1501を、血清対応型のB62として報告する

例2：HLA-Bローカスの4001を、血清対応型のB60として報告する

2. 血清対応型の推定は、WHO命名委員会報告に従う。血清型が不明とされている場合は、「血清対応型」として報告しない。

例1：HLA-Bローカスの1511を、血清対応型のB75と推定する

例2：HLA-Bローカスの1522を、血清対応型のB35と推定する

例3：HLA-Bローカスの1523は血清型が不明なため、血清対応型としては報告しない。また、ブランク「-」としても報告しない。

3. WHO命名委員会で血清型が不明あるいは親抗原型のみしか記載されていなくても、HLA学会標準化委員会において「血清対応型」が確認されている場合（別表）には、それを「血清対応型」として推定してもよい。

例1：HLA-Bローカスの1529を、血清対応型のB70と推定する

例2：HLA-Bローカスの4003を、血清対応型のB61と推定する

II. 表記について

1. ブランク「-」は、区別出来ないアレルの表記に用いる。

例1：HLA-Bローカスの「4002/03, -」は、両側のアレルが4002または4003の場合を示す

例2：上記の血清対応型の表記は、「B61, -」とする

2. 両側の血清対応型がアレルレベルで区別可能な場合は、両側に同一名を記載する。

例1：HLA-Bローカスの4002, 4003のヘテロ接合の血清対応型表記は、「B61, B61」とする

別表

WHO命名報告2000において血清型が不明とされている以下のアレルについては、日本人においては血清対応型が判明しているため、→の後に記載した血清対応型を用いて報告してもよい。

B*4007 →B60 (WHO命名報告2000では血清型不明)

B*1529 →B70 (WHO命名報告2000ではB15)

B*4003 →B61 (WHO命名報告2000ではB40)

B*4004 →B61 (WHO命名報告2000ではB40)

日本組織適合性学会HLA標準化委員会
(2002年9月23日)

2. 方法別報告

Micro-SSPキットの評価

荒関 みき

北海道赤十字血液センター

1. はじめに

Micro-SSPキットはPCR-SSP法を原理とする簡便なHLAタイピングキットであり、Low resolutionタイピング用キットからMiddle・High resolutionタイピング可能なキットまで各種存在する。

2. 参加施設・方法

使用したMicro-SSPのキット名と参加施設数を表1に示す。Low resolutionタイピングキットとして利用している施設が多いが、今回その中でも参加施設数が多く、誤判定が見られたSSP1L,SSPJPNのデータについての解析結果を報告する。

表1 Micro SSP 使用キット名と参加施設数

キット名	判定可能なLocus	解像度	参加施設数
SSP 1L	A,B,C	Low	14
SSP JPN	日本人特有なA,B,C,DR,DQ	Low	11
SSP 2L	DR,DQ	Low	10
SSP-ABDR	A,B,DR	Low	1
SSP 2H	DRB1	High	2
SSP2-101	DRB1*01	High	1
SSP2-104	DRB1*04	High	3
SSP2-108	DRB1*08	High	1
SSP2-111	DRB1*11	High	1
SSP2-112	DRB1*12	High	1
SSP2-113	DRB1*13	High	1
SSP2-115	DRB1*15	High	1
SSP2-Q1	DQB1	High	2

3. 反応・判定結果

反応性の問題による誤判定例を表2~4に示す。SSP-1L(Lot#004)では、ウエル1Dが偽陰性となったためにA*2601/02/04/+と判定するところをA*2603/05/06/16と判定した施設があった(表2)。SSP JPN(Lot#2)では、サンプル#1406においてウエル9Dが偽陰性となったためCw*1502/05/06/07の判

表2 SSP 1L (Lot#004) 偽陰性反応による誤判定

Sample No	SSP 1Lでの判定	施設No	ウエル位置		誤判定内容			
			1	2				
#1401	A*2601/02/04/+	13	8	8 8	←A*2603/05/06/16			
		16	8	8 8				
		18	8	8 8				
		19	4	8 6				
		37	6	8 8				
		42	8	8 4				
		44	8	8 8				
		47	8	8 8				
		66	6	8 4				
		70	2	8 6				
		71	6	8 6				
		#1403	A*2601/02/04/+	13		8	8 8	←A*2603/05/06/16
16	8			8 8				
18	8			8 6				
19	7			8 4				
37	8			8 8				
42	8			8 4				
44	8			8 8				
47	8			8 8				
66	6			8 4				
71	6			8 6				
A*26の反応性								
A*2601/02/04/08/10~15/17				+	+	+		
A*2603/05/06/16			-	+	+			

表3 SSP JPN (Lot#002) 偽陰性反応による誤判定

Sample No	SSP JPNでの判定	施設No	ウエル位置		誤判定内容
			8	9	
#1406	Cw*0303, Cw*1502/05/06/07	2	8	8 6 6	← Cw*0303, Cw*0302/04 ← Cw*0303, Cw*0302/04/05/+
		18	8	8 8 6	
		21	8	8 8 8	
		22	8	8 8 8	
		34	8	8 6 7	
		38	8	8 8 7	
		44	8	8 8 8	
		49	8	8 8 8	
		64	8	8 8 8	
		71	8	8 8 8	
Cw*0303, Cw*1502他の反応性					
Cw*0303			+	+	- -
Cw*1502/05/06/07			-	-	+
Cw*0302/04/05/+			+	-	+

表4 SSP JPN (Lot#002) 偽陽性反応による誤判定

Sample No	SSP JPNでの判定	施設No	ウエル位置					誤判定内容
			3	4	7	8	9	
#1406	B*1501/04/07/+ , -	2	8	8 6	8	8 1	← B*1501/07/26N/+ , B*1508/11/15	
		18	8	8 6	1	8 1		
		21	8	8 8	1	8 1		
		22	8	8 8	8	8 1		
		34	8	8 8	1	8 1		
		38	8	8 8	1	8 1		
		44	8	8 8	1	8 1		
		49	8	8 8	1	8 1		
		64	8	8 8	1	8 1		
		71	8	8 8	1	8 1		
B*1501他の反応性								
B*1501/04/07/+			+	+	+	-	+	
B*1508/11/15			+	+	-	+	+	

表5 SSP JPN (Lot#002) キット側の問題と思われる偽陰性反応

Sample No	SSP JPNでの判定	施設No	ウエル位置					
			2 A	5 E D	7 C B	8	1	8
#1403	B*5401/5507, B*4002/03/08/09	2	8	8 4 8	1	8		
		18	8	8 4 8	1	8		
		21	8	8 2 8	1	8		
		22	8	8 7 8	1	8		
		38	8	8 8 8	1	8		
		49	8	8 7 8	1	8		
		57	8	8 7 8	1	8		
		64	8	8 4 8	1	8		
		71	8	8 7 8	1	8		
		#1404	B*5401, B*4403/07	2	8	6 4 8	8	1
18	8			8 4 8	8	1		
21	8			8 4 8	8	1		
22	8			8 7 8	8	1		
34	8			8 4 8	8	1		
38	8			8 8 8	8	1		
44	8			8 6 8	8	1		
49	8			8 4 8	8	1		
57	8			8 8 8	8	1		
64	8			8 7 8	8	1		
71	6	8 7 8	6	1				
B*5401他の反応性								
B*5401			+	+	+	-	-	
B*4002/03/08/09			-	-	-	-	+	
B*5507			+	+	+	+	+	
B*4403/07			-	-	-	+	-	

表6 アサインミスによる誤判定例

原因	トレイ名	Sample No	内容
判定不能ウエルを陰性として判定 ^{(*)1}	SSP 1L(Lot#004)	#1403	B*4002/06/08/09/+ → B*4006
		#1401	A-Locus判定保留 ^{(*)2} → A*2601/02/+,-
	SSP JPN(#Lot002)	#1402	DRB1*0401/02/03/+ → DRB1*0405/06/+
		#1405	A-Locus判定保留 ^{(*)3} → A*0201/02/03/+,- DRB1*判定保留 ^{(*)4} → DRB1*0901,-
判定表の読み間違い ^{(*)5}	SSP 1L(Lot#004)	#1404	Cw*1403 → Cw*1402/04/05
		#1401	Cw*0701/02/03/+ → Cw*0704/11/12
	SSP JPN(#Lot002)	#1403	A*2402/03/04/+ → A*1101/02/03/+
		#1404	B*4403/07 → B*4402/05/11
日本人用判定表による判定 ^{(*)6}	SSP JPN(#Lot002)	#1401	B*3801/02 → B*3802
			Cw*0701/02/03/+ → Cw*0702/+
			DRB1*0101/02/04/05 → DRB1*0101/05

(*)1 内容欄矢印左側は判定不能ウエルを保留とした判定結果の表記で右側が判定不能ウエルを陰性として誤判定した内容
 (*)2 #1401のA-LocusはA*0201,A*2601
 (*)3 #1405のA-LocusはA*0206,A*2402
 (*)4 #1405のDRB1*はDRB1*0901,DRB1*08032
 (*)5 内容欄矢印左側は正しい判定結果表記で右側は誤判定内容
 (*)6 内容欄矢印左側は判定表のCommon Japanese Alleles欄とOther Alleles欄の両方を考慮した判定結果で、右側はCommon Japanese Alleles欄のみでの判定を行った誤判定内容

定ができなかった施設(表3)と、同じく#1406において本来B*1501ホモの反応パターンとなるところをウエル4Eが偽陽性となったため、B*1508/11/15をもアサインしていた施設があった(表4)。また、SSP JPN(Lot#2)においてウエル5Dの反応性の弱さが確認された(表5)が、この反応性が原因で判定不能とした施設はあるものの、誤判定となった施設はなかった。これはKeyとなるウエル(ウエル5EはB*5401とB*5507のみ陽性)が陽性で

あったためと考えられる。ただし、サンプル#1404については、B*5401とB*5507を鑑別する唯一のウエル7Bの反応性をもとにB*5401とアサインすることができたが、サンプル#1403ではウエル7Bがもう一方のアリルB*4002で陽性であることから鑑別に使うことができないため、B*5401とアサインすることができず、このキットにおいては、B*5401/5507と判定するのが正しいと思われる。

アサインミスによる誤判定を表6に示す。判定不応ウエルを陰性として判定したためにおきた誤判定が多かった。その他に、判定表の読み間違い、SSP JPNにおける日本人用判定表による判定を行ったための誤判定があった。

4. 問題点

反応性で問題となったウエルのうち、SSP JPNのウエル5Dについてはメーカー側で既に対応済みであり、次ロットより改善される予定である。他のウエルについては、他の多くの施設で正しい反応性が得られていることから、これについては施設間差の問題と捉えてメーカー側の適切な情報提供等の対応を望みたい。

アサインミスの中で判定不能ウエルの対処を誤ったためのミス、判定表の利用法を誤ったためのミスについては施設が限られているため今回このQCワークショップを機会に改善されることを望む。判定表の読み間違いによるミスはどこの施設でも起こる可能性があり、それをいかに無くしていくかについて各施設が真剣に取り組んでいくべき問題と考える。

5. まとめ

Micro-SSPキットの反応性は全体的に特に問題なく、一部の施設を除いては正確な判定が行われていると思われる。しかし、SSP JPNは1キット(96ウエル)でA,B,C,DR,DQローカスをタイピング可能としており、用いるプライマーを日本人に多いタイプを中心に厳選しているため、ホモタイプの時には他法で確認するなどメーカー側の指導を厳守する必要

がある。また判定表の読み間違いによるミスは判定時にダブルチェック体制をとるなど検査体制面からの改善を考慮すべきである。さらにLow resolution キットに関しては、他法との併用なしに安易に4ケタでの結果を出さず、2ケタでの報告をすることが望ましいと考える。

Micro-SSPは操作が容易なことから、HLA検査ま

たはDNA検査に不慣れな施設でも導入しやすい検査法の一つである。しかし正しい判定、解析がなされないと大きなタイピングミスにつながるため、メーカー側は適切な情報提供を行い、かつ導入施設側はキットの特徴を正しく理解した上で利用することが重要と考える。

UniTray の評価

木原正明, 石川登志子, 松浦宏美

三菱化学ピーシーエル, 検査第二部 細胞性免疫グループ

1. はじめに

ペルフリーズ社ユニトレイは、SSP法に基づいており、特異的バンドの有無によってHLAアレルを判定するキットである。キット形状は、あらかじめプライマーがプレートに分注された形になっている。キットの構成は、クラス I, IIそれぞれにおいて、2桁レベルで判定する Low-resolution, 4桁レベルで判定する High-resolution のキットに大別される。High-resolution のキットのA, B, DRB1は Low で得られた結果を元にキットを選択し High-resolution タイピングを実施する。一方, C, DQB1

については Low の結果は必要無くダイレクトにタイピングが行える。SSP法を用いた市販キットの中では、比較的 High-resolution キットのバリエーションが豊富である。

2. 参加施設・方法

参加施設は7施設で、Low-resolution を使用した施設はA, B, C:7施設, DRB1:4施設, DQB1:2施設, である。High-resolution を使用した施設はA, B, DRB1:2施設, DQB1:1施設, であった。他のタイピング方法を併用している施設が5施設あったが、

提出された生データからユニトレイのみで得られた結果に置き換えて解析を行った(表1)。なお、生データから報告データに転記する際に生じたと思われた単純な記入ミスについては生データを解析に用いた。

表1 ユニトレイ使用状況

施設No	A*		B*		C*		other	DRB1*		other	DQB1*		other
	Low	High	Low	High	Low	High		Low	High		Low	High	
4	○		○		○			○			○		
51	○		○		○			○			○		
6	○	○	○	○	○			○	○	5			5
27	○		○		○		1			1			
32	○		○		○					5			5
54	○		○		○		1. 2. 3			1. 2. 3			1. 4
11	○	○	○	○	○		1	○	○	4		○	4

other 1. SSO 2. SSCP 3. SBT 4. RFLP 5. SSP(他のキット)

表2 クラスII結果

サンプルNo	H1401				H1402				H1403			
	DRB1-1		DRB1-2		DRB1-1		DRB1-2		DRB1-1		DRB1-2	
	Low	High										
施設No												
4	*0101/02/04/+		*1201/02/03/+		*0401/02/03/+		-		*0401/02/03/+		*1101/02/03/+	
51	*0101/02/04/+		*1201/02/03/+		*0401/02/03/+		-		*0401/02/03/+		*1101/02/03/+	
6	*0101/02/04/+	*0102	*1201/02/03/+	*1202	*0401/02/03/+	*0404	*0401/02/03/+	*0404	*0401/02/03/+	*0405	*1101/02/03/+	*1106
11	*01	*0102	*12	*1202	*04	*0404	-	-	*04	*0405	*11	*1106
コンセンサス	*0102		*1202		*0404		-		*0405		*1106	
施設No	DQB1-1		DQB1-2		DQB1-1		DQB1-2		DQB1-1		DQB1-2	
4	*0301/04		*0501/02/03/+		*0302		-		*0301/04		*0401/02	
51	*0301/04/09/+		*0501/02/03/+		*0302/05/08		-		*0301/04/09/+		*0401/02	
11		*0301		*0501		*0302		-		*0301		*0401
コンセンサス	*0301		*0501		*0302		-		*0301		*0401	

サンプルNo	H1404				H1405				H1406			
	DRB1-1		DRB1-2		DRB1-1		DRB1-2		DRB1-1		DRB1-2	
	Low	High	Low	High								
施設No												
4	*0401/02/03/+		*1301/02/03/+		*0801/02/03/+		*0901		*0401/02/03/+		-	
51	*0401/02/03/+		*1301/02/03/+		*0801/02/03/+		*0901		*0401/02/03/+		-	
6	*0401/02/03/+	*0405	*1301/02/03/+	*1302	*0801/02/03/+	*0803	*0901		*0401/02/03/+	*0405	-	*0406
11	*04	*0405	*13	*1302	*08	*0803	*0901		*04	*0405	-	*0406
コンセンサス	*0405		*1302		*0803		*0901		*0405		*0406	
施設No	DQB1-1		DQB1-2		DQB1-1		DQB1-2		DQB1-1		DQB1-2	
4	*0401/02		*0602/03/04/+		*0303		*0601/06		*0302		*0401/02	
51	*0401/02		*0601/02/03/+		*0303		*0601/02/03/+		*0302/05/08		*0401/02	
11		*0401		*0604		*0303		*0601		*0302		*0401
コンセンサス	*0401		*0604		*0303		*0601		*0302		*0401	

表3 クラスI結果

サンプルNo	H1401				H1402				H1403			
	A-1		A-2		A-1		A-2		A-1		A-2	
	Low	High										
施設No												
4	*0201/02/03/+		*2601/02/04/+		*0101/02/03/+		*2601/02/04/+		*2402/03/04/+		*2601/02/04/+	
51	*0201/02/03/+		*2601/02/04/+		*0101/02/03/+		*2601/02/04/+		*2402/03/04/+		*2601/02/04/+	
6	*0201/02/03/+	*0201	*2601/02/04/+	*2601	*0101/02/03/+		*2601/02/04/+	*2601	*2402/03/04/+	*2402	*2601/02/04/+	*2601
27	*02		*26		*01		*26		*24		*26	
32	*0201/02/03/+		*2601/02/04/+		*0101/02/03/+		*2601/02/04/+		*2402/03/04/+		*2601/02/04/+	
54	*0201/02/03/+		*2601/02/04/+		*0101/02/03/+		*2601/02/04/+		*2402/03/04/+		*2601/02/04/+	
11	*02	*0201	*26	*2601	*01		*26	*2601	*24	*2402	*26	*2601
コンセンサス	*0201		*2601		*0101		*2601		*2402		*2601	
施設No	B-1		B-2		B-1		B-2		B-1		B-2	
4	*1517		*3801/02/04/+		*2701/03/05/+		4001/07/10/+		*5401/02		4002/03/06/+	
51	*1517		*3801/02/04/+		*2701/03/05/+		4001/07/10/+		*5401/02		4002/03/06/+	
6	*1517		*3801/02/04/+		*2701/03/05/+		4001/07/10/+	*4001	*5401/02		4002/03/06/+	*4002
27	*15				*27		*40		*54		*40	
32	*1517		*3801/02/04/+		*2701/03/05/+		*4001/07/10/+		*5401/02		4002/03/06/+	
54	*1517		*3801/02/04/+		*27		4001/07/10/+		*5401/02		4002/03/06/+	
11	*1517		*38		*27	*2705	*40	*4001	*54		*40	*4002
コンセンサス	*1517		*3801		*2705		*4001		*5401		*4002	
施設No	C-1		C-2		C-1		C-2		C-1		C-2	
4	*0701/04/05/+		*1203/04/07/+		*0202/04		*0304/06/07/+		*0102/03/05		*0304/06/07/+	
51	*0701/04/05/+		*1203/06/07		*0202		*0304/06/07/+		*0102/03		*0304/06/07/+	
6	*0701/04/05/+		*1203/06/07		*0202		*0304/06/07/+		*0102/03		*0304/06/07/+	
27	*07		*12		*02				*01		*03	
32	*0701/04/05/+		*1203/06/07		*0202		*0304/06/07/+		*0102/03		*0304/06/07/+	
54	*07		*12		*0202		*03		*01		*03	
11	*07		*12		*0202		*03		*01		*03	
コンセンサス	*0701		*1203		*0202		*0304		*0102		*0304	

サンプルNo	H1404				H1405				H1406			
	A-1		A-2		A-1		A-2		A-1		A-2	
	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High
施設No												
4	*2402/03/04/+		*3301/03/04/+		*0201/02/03/+		*2402/03/04/+		*0201/02/03/+		*3301/03/04/+	
51	*2402/03/04/+		*3301/03/04/+		*0201/02/03/+		*2402/03/04/+		*0201/02/03/+		*3301/03/04/+	
6	*2402/03/04/+	*2402	*3301/03/+		*0201/02/03/+	*0206	*2402/03/04/+	*2402	*0201/02/03/+	*0201	*3301/03/+	
27	*24		*33		ND		ND		*02		*33	
32	*2402/03/04/+		*3301/03/04/+		*0201/02/03/+		*2402/03/04/+		*0201/02/03/+		*3301/03/04/+	
54	*2402/03/04/+		*3301/03/04/+		*0201/02/03/+		*2402/03/04/+		*0201/02/03/+		*3301/03/04/+	
11	*24	*2402	*33		*02	*0206	*24	*2402	*02	*0201	*33	
コンセンサス	*2402		*3303		*0206		*2402		*0201		*3303	
施設No	B-1		B-2		B-1		B-2		B-1		B-2	
4	*4403/04/07/+		*5401/02		*4601/02		*5201/02/03		*1501/04/07/+		-	
51	*4403/04/07/+		*5401/02		*4601/02		*5201/02/03		*1501/04/07/+		-	
6	*4403/04/+		*5401/02		*4601/02		*5201/02/+		*1501/04/07/+	*1501	*1501/04/07/+	*1501
27	*44		*54		ND		ND		*15		-	
32	*4403/04/07/+		*5401/02		*4601/02		*5201/02/03		*15		*15	
54	*4403/04/07/+		*5401/02		*4601/02		*5201/02/03		*1501/04/07/+		-	
11	*44	*4403	*54		*46		*52		*15	*1501	-	-
コンセンサス	*4403		*5401		*4601		*5201		*1501		-	
施設No	C-1		C-2		C-1		C-2		C-1		C-2	
4	*0102/03/05		*1403		*0102/03/05		*1202/08		*0303/11/12		*1502/03/04/+	
51	*0102/03		*1403		*0102/03		*1202		*0303/11/12		*1502/03/04/+	
6	*0102/03/+		*1403		*0102/03/+		*1202/08		*0303/11/+		*1502	
27	*01		*14		ND		ND		*03		*15	
32	*0102/03		*1403		*0102/03		*1202		*0303/11/12		*1502/03/04/+	
54	*01		*1403		*01		*12		*03		*15	
11	*01		*1403		*01		*1202		*03		*15	
コンセンサス	*0102		*1403		*0102		*1202		*0303		*1502	

3. 反応・判定結果

1) クラスII結果

Low-resolution キットを使用した施設及び High-resolution キットを使用した施設、共に結果はコンセンサスデータと一致した(表2)。また、生データスコアにおいてもコンセンサスデータとの矛盾は無く、特に問題は認められなかった。しかし、DQB1Low-resolution の結果において Ambiguity のアリル数に違いがみられた。これはキットのロットの違いによるものであった。

2) クラスI結果

Low-resolution キットを使用した施設において、次に示すコンセンサスデータとの不一致が2件認められた(表3)。コンセンサスデータを『 』内に示す。

①H1401において

B*15, 47 『B*15, 38』

②H1402において

C*02, 03 (or15) 『C*02, 03』

①の解析

各施設のH1401のB Low-resolution のスコアを比較した(表4)。不一致が発生した施設はB*38が陽性となるプライマーNo45, 46, 66が全て陰性を示し

表4 H1401 B Low-resolutionスコア(抜粋)

プライマーNo	25	38	45	46	47	66	41		
反応アレル	BW4	B*15	B*38	B*35/38/39	B*15/40/47	B*38/39/+	B*27/47		
施設 No	27	8	8	1	1	8	1	8	Lot ABC24
	32	8	8	8	8	0	8	1	Lot ABC24
	54	8	8	8	8	8	1	1	Lot ABC24
	11	8	8	8	8	8	4	1	Lot ABC24
	4	8	8	8	8	8	8	1	Lot ABDR21
	51	8	4	8	8	8	8	1	Lot ABDR20
	6	6	6	6	6	6	6	8	1

表5 H1402 C Low-resolutionスコア(抜粋)

プライマーNo	75	76	77	84	90	93	95		
反応アレル	CW*02/17	CW*03	CW*02/15/+	CW*02/15/+	CW*03/07/15	CW*17	B*02/15/+		
施設 No	27	8	8	8	8	8	1	8	Lot ABC24
	32	8	8	8	8	8	1	8	Lot ABC24
	54	8	8	4	4	8	1	8	Lot ABC24
	11	8	8	8	8	8	1	8	Lot ABC24

た。これは、他施設のデータから false negative と考えられる。また、他施設が陰性であったNo41のプライマー (B*47) を陽性としていたが、これはプライマーダイマーを陽性バンドと取り違えたものと考えられた。

②の解析

各施設のH1402のC Low-resolution のスコアには特に差異は認められなかった (表5)。Cw*15に反応するプライマーNo77, 84, 90, 95は確かに全て陽性であるが、No76が陽性によりCw*03が確定し、No75が陽性、No93が陰性によりCw*02が確定する。従ってプライマーNo77, 84, 90, 95の陽性バンドはCw*02, Cw*03による産物であって、この不一致は判定上のミスであると考えられた。

4. 問題点, まとめ

- 1) クラス I, クラス II 全体のコンセンサスデータとの一致率は99.4%と良好な結果を示した。

- 2) 古いロットのキットは判定アレル数が少なく Ambiguity の表記に漏れが発生する可能性が高い。また、4桁が判定されるケースもあり、古いロットのキットを使用する際は注意が必要と考えられた。

- 3) 1つのアレルが false negative により判定出来ない例があった。false negative の原因は不明であるがサーマルサイクラーの温度校正が正確で無い可能性が高いと思われる。ユニットレイにはサーマルサイクラーの校正確認用キ

ットであるユニチェックがあり、これにより定期的にサーマルサイクラーの状態を確認することが望ましいと考える。

また、キット自体も特にクラス I においてPCRがかかりにくい部分があり改良が望まれる。

- 4) 陽性バンドの取り違いによるミスタイピング、判定上のミスタイピングが各1件あった。ユニットレイ判定プログラムを用いて判定を行えばこれらは回避できる可能性が高い。また、アレルの増加に伴い判定表は複雑化しており、判定表のみの判定は避けるべきである。

Dynal RELI-A,-B,-Cw,-DRB,-DQBの検討

今井厚子¹⁾, 関 佐織²⁾, 平田蘭子¹⁾

¹⁾埼玉医科大学総合医療センター輸血・細胞治療部, ²⁾埼玉医科大学附属病院, HLA検査センター

1. はじめに

Dynal RELIは、血清学タイピングに相当するA, B, Cw, DRB, DQBが個別にキット化されており、各ローカス用プライマーとプローブストリップの組み合わせ以外の試薬、反応条件などはすべて同一に設定されている。

2. 回答施設数

クラスIでは、回答のあった76施設のうちA, Bは24施設(31.6%), Cwは回答44施設のうち5施設(11.4%)で使用されていた。クラスIIでは、DRBは回答75施設のうち24施設(32%), DQBは回答49施設のうち4施設(8.2%)で使用されており、これらの施設から提出されたスコアシートをもとに検討した。RELI使用24施設の増幅装置については、21施設(87.5%)がパーキンエルマー社の9600または9700, その他ATTO AB1820, FUNAKOSHI PTC-150, ASTEC PC-800を使用していた。また、DNA抽出方法は、11施設がグアニジン法, SSPクイクバッファ5施設, ドナクイック3施設, プロテナーゼK法3施設, スピンカラム法1施設, 不明1施設であったが、これらの装置やDNA抽出方法の違いによるキットへの影響は無いものと考えられた。

3. クラス I

1) HLA-A

Lowレベルでの判定結果は一致していたが、2例の4桁でのタイプに不一致があった(表1)。サンプルH1403の回答で、A*2601を*2608との判定があり、プローブ29で発色が認められず陰性と判定したためと考えられた。H1404の回答で、A*2402を*2404との判定があり、プローブ14, 15のストリップ反応からの読みとりミスが考えられた。プローブ1, 2, 9, 21, 25, 27, 29の反応でスコア2, 4の弱い反応結果が複数の施設から報告されていた。

2) HLA-B

結果の表記は様々であった(表2)。Lowレベルでの一致率は94.2%であったが14例の判定に問題がみられた(表3)。サンプルH1401では、B*1507, blankとの回答があり、全体的に陽性プローブの反応が弱く判定が困難であったと考えられ、また、キット添付の日本人用早見表に適合しないため判定不能との回答もあった。H1403では、プローブ6で発色が認められずB*40, *5402との判定があり、また、H1403, H1404の回答でB*5401とB*5507の反応パターンが同一のため区別ができず、B*5401, *5507またはB*54, *55との判定が9例あった。

表1 RELI-A

A	A* RELI	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		
A24	2402/09N						6				10					15		17					22	23				28					32		34	35		
	2404						6				10			14			17						22	23				28					32		34	35		
A26	2601/02	1							8	9	10				14		17							24					29	30							35	
	2608	1							8	9	10				14		17							24				28	30								35	
A33	3301/03								8	9	10			13			17					21				25		27						32		35		
	sample NO	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		
1	H1403	6					6		6	6	8				6	6		4					6	6	6			6		6		6		6	6	4	2608	24
2	H1404						8		8	8	8			8	8			4					6	8	8		6		6	8				8	8	4	2404	3301/03/04/+

表2 RELI-Bによる表記

H1401				H1402				H1403					
#1B-1	n	%	#1B-2	#2B-1	n	%	#2B-2	#3B-1	n	%	#3B-2	n	%
1517	14	61.0	3801	1 27	3	13.0	4001/14	4002	11	47.8	5401	12	52.2
*1517	4	17.5	*3801	2 2705	3	13.0	4001	*4002	4	17.4	*5401	4	17.4
15	1	4.3	38	3 2703/	2	8.8	*4001	40	2	8.8	54	1	4.3
B*1517	1	4.3	B*3801	4 2703/05/09/+	2	8.8	40	4002/27/29	2	8.8	B54	1	4.3
B15	1	4.3	B38	5 2703/05/10	2	8.8	4001/	4002/	1	4.3	54/55	1	4.3
1507	1	4.3	記入無し	6 2703/05/10/+	2	8.8	*4001/14	B*4002/27/29	1	4.3	5401,5507	1	4.3
判定不能	1	4.3	判定不能	7 *2703	1	4.3	*4001/14/22N	61	1	4.3	5401/5507	1	4.3
	23	100		8 *2703/05/10	1	4.3	4001/11/14/+	B61	1	4.3	B*5401/5507	1	4.3
				9 *2703/05/10/13/07	1	4.3	4001/14/22		23	100	5402	1	4.3
				10 *2705	1	4.3	4001/14/22/+					23	100
				11 2703/05	1	4.3	4001/14/22N						
				12 2703/05/	1	4.3	40011/						
				13 2703/05/+	1	4.3	B*4001/11/14/+						
				14 B*2703/05/09/+	1	4.3	60						
				15 B27	1	4.3	B60						
					23	100							

H1404				H1405				H1406					
#4B-1	n	%	#4B-2	#5B-1	n	%	#5B-2	#6B-1	n	%	#6B-2	n	%
4403	5	22.7	5401	4601	9	39.2	5201	1 1501/12/19/+	8	33.2	-	14	58.2
4403/07	4	18.2	*5401	4601/02	6	26.2	*5201	2 1501	3	12.5	記入無し	7	29.2
44	3	13.6	54/55	*4601	4	17.4	5201/	3 *1501	2	8.3	*1501/12/+	1	4.2
4403/	3	13.6	54	4601/	1	4.3	52011/	4 15	2	8.3	1524	1	4.2
*4403	2	9.1	5401/5507	B*4601/02	1	4.3	B*5201	5 1501/	2	8.3	4403	1	4.2
*4403/07	2	9.1	5504,5507	46	1	4.3	52	6 *1501/12/+	1	4.2		24	100
4403/07/13	2	9.1	B*5401/5507	B46	1	4.3	B52	7 *1501/12/19/33/34/60	1	4.2			
B*4403/07/13	1	4.6			23	100		8 1501/12	1	4.2			
	22	100						9 1501/12/	1	4.2			
								10 B*1501/12/19/+	1	4.2			
								11 B15	1	4.2			
								12 62	1	4.2			
									24	100			

スマイテストHLA-SPPキットの評価

安田広康, 渡部和也, 大戸 斉

福島県立医科大学医学部附属病院, 輸血・移植免疫部

1. はじめに

スマイテストHLA-SPP(sequence specific primer and probe)法は, 増幅補助溶液としてAmpdirect™(株式会社島津製作所)を使用し, DNAの抽出および精製を行うことなく全血をそのまま使用できることを特徴とする。

本法は, まず1st PCRにおいて増幅補助溶液の存在下で, HLA-A,B,DRB1の各領域のエクソン2やエクソン3領域の全長を特異的プライマーを用いて増幅する。2nd PCRでは, 1st PCRでの増幅産物を鋳型として, ピオチン化特異的プライマーを用いたSSP法によりさらに増幅する。検出では, 特異的プローブを固相化した各ウエルに, 2nd PCR産物を加えハイブリダイズし, HRP標識ストレプトアビジンを結合させ, 基質を添加して発色させた後, 450 nmで吸光度を測定する。尚, 各アレルタイピングに使用する特異的プライマーおよび特異的プローブは, HLA-AおよびDRB1では16種, HLA-Bでは32種である。また, ハイブリダイゼーションは37°C, 30分で施行した。

2. 参加施設・方法

第6回HLA-QCワークショップに参加したのべ9施設から提出された生データをもとに評価した。各アレルごとの参加施設数の内訳は, HLA-Aが7施設, HLA-Bが5施設, HLA-DRB1が4施設であった。また, 評価に際し発色後の吸光度(OD)をスコア化した。すなわち, スコア8はOD 2.000以上, スコア6はOD 1.000~1.999, スコア4はOD 0.500~0.999, スコア2はOD 0.250~0.455, スコア1はOD 0.250以下とした。

3. 結果

各アレルに対する反応性についてTable 1~3に示した。各Tableにおいて, 特異的または非特異的反応を示したウエル数をスコア別に上表に示し, 各特異的アレルの反応性については, 総ウエル数, スコアの中央値とその範囲, 偽陰性あるいは偽陽性反応のウエル数を下表に示した。

HLA-A アレル全体における非特異的反応の割合は, 参加7施設, 総672ウエル中わずかに5ウエル(0.7%)で, その反応は弱陽性であった。しかし, 特異的反応においてスコア2の偽陰性を示したウエルが2箇所(2施設)あったが, それはA*01アレルとの反応であった(Table.1)。

HLA-DRB1アレルにおける非特異的反応は, 参加4施設, 総384ウエルで全く認めなかった。しかし, 特異的反応においてスコア2の偽陰性反応を示したウエルが3箇所あった。その内訳はDRB1*04の2ウエル(2施設)とDRB1*12の1ウエル(1施設)であった(Table.2)。

HLA-B アレルにおける非特異的反応は, 参加5施設, 総842ウエル中21ウエル(2.5%)に認めた。非特異的反応で偽陽性を呈した反応は8ウエルで, B*1517(63)を有するサンプルH1401において認めた。内訳は, HLA-B*58, *59の30ウエルのうちそれぞれ4ウエル, 3ウエルであった。これにはハイブリダイゼーションの際, B*1517(63)の増幅産物がB*58, B*59のプローブと交差反応したためと考える。また, 非特異的反応での偽陰性反応はB*3801を有する同じH1401で認め, 5ウエル(5施設)全てで検出できなかった。これは, 本キットが日本人に稀なB*3801にではなく, よりポピュラーなB*3802にのみに対応しているためである。さ

Table 1 Reactivity to HLA-A alleles of 6 QC samples by PCR-SPP

Participant: n= 7 Probe:n= 16						
Score	8	6	4	2	1	Total
Number of wells with specific reaction	57	12	13	2	583	672
Number of wells with nonspecific reaction	0	0	0	5	0	5 (0.7%)
HLA-A	*01	*02	*24	*26	*33	
Number of wells	7	21	21	21	14	
Median	4	8	8	8	6	
Range	2-8	6-8	4-8	4-8	4-8	
False negative	2	0	0	0	0	

Table 2 Reactivity to HLA-DRB1 alleles of 6 QC samples by PCR-SPP

Participant: n= 4 Probe:n= 16							
Score	8	6	4	2	1	Total	
Number of wells with specific reaction	24	7	6	3	344	384	
Number of wells with nonspecific reaction	0	0	0	0	0	0 (0%)	
HLA-DRB1	*01	*04	*08	*09	*11	*12	*13
Number of wells	4	16	4	4	4	4	4
Median	8	8	8	8	8	6	6
Range	8-8	2-8	4-8	6-8	4-8	2-8	4-8
False negative	0	2	0	0	0	1	0

Table 3 Reactivity to HLA-B alleles of 6 QC samples by PCR-SPP

Participant: n= 5 Probe:n= 32								
Score	8	6	4	2	1	Total		
Number of wells with specific reaction	19	16	11	5	789	840		
Number of wells with nonspecific reaction	3	3	2	7	5	21 (2.5%)		
HLA-B	*58	*59	*40(61)	*15(62)	*27	*46	*54	*3801
Number of wells	30	30	30	5	5	5	10	5
Median	1	1	1	6	8	6	4	1
Range	1-8	1-8	1-4	2-8	2-8	2-8	2-6	-
False negative				1	1	1	2	5
False positive	4	3	1					

らに、特異的反應での偽陰性反應は、B*15(62), B*27, B*46においてそれぞれ1ウエル(各1施設), B*54では2ウエル(同一施設)認めた。一方、それ以外のB*44, B*52, B*40(60), B*40(61), B B*1517(63)との反應では偽陰性反應は認めず、各スコアの中央値も6~8と良好であった。

施設間の反應性の違いについて、A, B, DRB1ごとに比較した。

参加は全部で9施設あったが、A, B, DRB1すべてに参加したのは3施設のみであった。施設間の各ローカスの平均スコア(範囲)はそれぞれAローカス7.0(5.8~8.0), Bローカス6.0(4.8~7.6), DRB1ローカス6.6(6.2~7.4)と、Bローカス・アリルとの反應性が最も低く、施設間の平均スコアにもばらつきを認めた。この原因として、サーマルサイクラーの温度設定が機種によっては困難であったためと考える。

4. まとめ

1) スマイテストHLA-SPP法によるHLA-A, -B, -DRB1の各タイピング結果から、特にBローカスの一部のアリルとの反應性が低かった。

2) また、allele間あるいは施設間でスコア(反應強度)にばらつきが認められた。

3) 日本人に稀なアリルB*3801やB*1517(63)では、偽陰性あるいは非特異的反應を呈することがある。

4) 反應性の全般的評価としては、平均スコアは6以上であり、また発色後のバックグラウンドも低く偽陽性反應は少なかった。

5) 以上から、本法は日本人を対象としたLow resolution法としてのHLAタイピングに有用と思われる。

PCR-MPHの評価

加藤 道

愛知県赤十字血液センター，検査二課

1. はじめに

湧永製薬のr-SSOによるHLAタイピングキットPCR-MPHは、5'末端ビオチン標識プライマーを用いて目的の遺伝子領域をPCR法で増幅し、その増幅物をマイクロプレートに固定したプローブとハイブリダイズさせ、さらに酵素標識アビジンをビオチンを介して結合させ、発色によりハイブリダイズした増幅DNAを検出する方法である。キットの種類も非常に豊富でClass I 及びClass II合わせて17種類のキットが市販されている。判定についても判定用ソフトがサポートされており容易に判定が可能である。

2. 参加施設・方法

参加施設は16施設であった。使用されたキットの種類及び参加施設数を表1に示す。

今回から新たにMPH-2のキットが加わったために、Class I 13種類、Class II 10種類と使用キットの種類が増えたが（昨年14種類）、データが提出されたMPH-2のキットは、全てメーカーからの検討用の試供品であり市販されているものではなかった。また、MPH-2 HLA-A, B, DR以外は1キットのみの提出であり検討の対象からは除外した。

プローブの反応性或いは判定結果に不一致があった7種類のキットについて、

クロスハイブリダイゼーション（以下「クロス」）及びテクニカル的な問題等を検討した。なお、検討の対象となったその他のキットについては良好な結果が得られていた。

3. 反応・判定結果

1) HLA-B（表2）

同一施設（施設番号15）から提出されたデータで、H1401のNo.17、H1406のNo.20に偽陽性がみられた。

H1401はNo.17が陽性の場合2桁判定はB*39になるはずだが、B*38が判定できているのはOD値0.45（cut off値0.35）と反応性が弱いため、このプローブを考慮（陰性として）

表1 使用試薬及び参加施設数

Class I			Class II		
試薬	解像度	参加施設数	試薬	解像度	参加施設数
HLA-A	Low	2	ジーンカラー-HLA-DR	Low	9
MPH-2 HLA-A	Low	10	MPH-2 HLA-DR	Low	8
HLA-A2	High	7	HLA-DR1	High	4
MPH-2 HLA-A2	High	1	HLA-DR3/11/13/14	High	6
HLA-A26	High	7	MPH-2 HLA-DR3/11/13/14	High	1
MPH-2 HLA-A26	High	1	HLA-DR4	High	5
HLA-B	High	2	MPH-2 HLA-DR4	High	1
MPH-2 HLA-B	High	10	HLA-DR12/8	High	4
HLA-B5	High	1	MPH-2 HLA-DR12/8	High	1
HLA-B15	High	6	HLA-DQ	Low	3
MPH-2 HLA-B15	High	1			
HLA-B40	High	5			
HLA-C	Middle	4			

(13種類)

(10種類)

表2 HLA-Bの反応と判定結果

検体番号	施設	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	22	B-1	B-2
H1401	15	8	8				8			8								8	8	6		6	8	*3801/02	*15
	56	8	8				8			8			2	8					8	8	2	6	8	*3801/02	*5701/+
H1406	15			8			8			8								8		4	8	8	*1501/02/04/+	-	
	56			8			8			6	2							8		8		8	*15	-	

(反応スコア=1は空白で表示)

表3 MPH-2 HLA-Bの反応と判定結果

検体番号	施設	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	22	23	24	B-1	B-2
H1404	9施設	8	8			8	8	8		8				8	8	8	8			8	8	8				*44	*54
	47	8	8			8	8	8		8				8	8	8	7			8	8	8				*44	*5401/02
H1406	9施設	8					8						8	8			8								*15	-	
	47	8					8						8	8			8						8	8	*15	-	

(反応スコア-1は空白で表示)

表4 MPH-2 HLA-DRの反応と判定結果

検体番号	施設	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	22	23	24	B-1	B-2
H1402	7施設				8													8	8						8	*04	-
	60				8													8	8	8	8				8	*04	-
H1403	6施設			8	8							8						8	8	8	8				8	*04	*11
	26			8	8							8						6	8	4	8	8			8	*04	*11
H1404	7施設			8	8									8				8	8	8	8				8	*04	*13
	60			8	8									8				8	8	8	8	8			8	*04	*13

(反応スコア-1は空白で表示)

表5 MPH-2 HLA-DRの反応と判定結果

検体番号	施設	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	22	23	24	B-1	B-2
H1405	23					8	8														8	8	8	8	8	*08	*09
	26					8	8														8	8	8	8	8	*08	*09012
	31					8	8														8	8	8	8	8	*0801/02+	*09012
	41					8	8														8	8	8	8	8	*08	*09
	46					8	8														8	2	8	8	8	*0801/02+	*09012
	56					8	8														8	2	8	8	8	*08	*09012
	60					8	8														2	2	8	8	8	*08	*09
	66					8	8														8	8	8	8	8	*0801/02+	*0901

(反応スコア-1は空白で表示)

*08のクロス・ハイブリダイゼーション

して判定したと思われる。

H1406のNo.20は陽性の場合でも、2桁判定はB*15と判定され判定結果に問題はなかった。

No.17, No.20いずれもアミノ酸シーケンスからクロスは考えられないため、今回の偽陽性は酵素液を加えた後の洗浄が十分でない場合に発生する、テクニカル的なことが原因で起こったものと考えられる。

2) MPH-2 HLA-B (表3)

同一施設 (施設番号47) から提出されたデータで、H1404のNo.16に偽陰性、H1406のNo.22に偽陽性がみられた。

今回のMPH-2 HLA-Bキットは、データを提出した10施設全てが試供品で3種類のロットが使用され

ていた。その中で47が使用したキットは、唯一初期のロットを使用しており、2番目のロットからは試薬の調整法、カットオフ値等が改良されているため、上記2つのデータを新しいカットオフ値に照らし合わせて検討してみた。

H1404のNo.16はカットオフ値1.3に対しOD値0.8のため陰性と判定されるが、他の9施設の内3施設の反応が弱陽性であり、メーカーにも確認したところB*44に対して反応性が弱いプローブであることが判明したため、本キットを使用し

H1406のNo.22はカットオフ値1.1に対しOD値1.0のため改良されたカットオフ値では陰性になり問題はなかった。

なお、何れも元のスコアにおいて2桁判定では問題はな

った。

3) ジーンカラーHLA-DR

ジーンカラーHLA-DRは、骨髄バンク二次検査用にも使用されている試薬であり、判定ミスにつながるような反応は無かったが、元々、DR*04 (No.4) のプローブの反応性が弱いことが指摘されており、今回のデータにおいてもDR*04との反応性が弱い傾向がみられ、特にDR*04ヘテロの場合にそれが顕著にみられた。

4) MPH-2 HLA-DR (表4, 5)

表4において施設番号60に偽陽性が多くみられた。偽陽性がみられたプローブについてはクロスが考えられないため、当該施設に作業手順等確認した

表6 HLA-DR4の反応と判定結果

検体番号	施設	プローブNo												判定結果	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	B-1	B-2
H1406	15	8	8	8	8		8			8	8	8	*04051	*0406	
	52	4	4	6	8		6			8	8	8	*0405	*0406	
	54	6	8	8	8		6			6	8	8	*04051	*0406	
	56	4	8	8	8		6			8	8	8	*0405/28/29/30	*0406	
	66	7	8	8	8		8			6	8	8	*0405	*0406	

(反応スコアー1は空白で表示)

表7 HLA-DR3/11/13/14の反応と判定結果

検体番号	施設	プローブNo												No.12 OD値	判定結果	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	cut off:2.05	B-1	B-2
H1403	15			8			8						1	1.69	*1106	
	42			6			8						2	0.39	*1106	※2000.04期限切
	52			4			6						4	4.11	*1104	
	54			8			6						8	2.05	*1104	
	56			8			8						8	2.68	*1104/25/35	
	66			8			8						6	2.03	*1104/25/+	

(反応スコアー1は空白で表示)

※1106のクロス・ハイブリダイゼーション

表8 HLA-DQの反応と判定結果

検体番号	施設	プローブNo											判定結果	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	B-1	B-2
H1403	42						7	6	6	6	6	*03	-	※2001.11期限切
	54						6	8	8	8	8	*0303/	*04	
	56						6	8	8	8	8	*03	*04	

(反応スコアー1は空白で表示)

ところ、洗浄をジェットピペットとアスピレーターを使用し、マニュアルで実施しているという事であったため、洗浄が不十分なためのテクニカルなことが要因で発生した偽陽性であると考えられた。

表5ではNo.22のプローブにDR*08のクロス反応がみられるが、この反応については判定表に明記しており問題にはならなかった。

5) HLA-DR4 (表6)

施設番号66のNo.1が偽陰性であるが、No.1は元々発色の弱いプローブであったため、当該プローブのデータがOD値0.34 (カットオフ値0.35) とカットオフ値に近いことから、判定時にプローブの反応性を考慮する必要があったと思われた。但し、No.1が陰性であっても4桁判定では不一致にならなかった。

6) HLA-DR3/11/13/14 (表7)

H1403はNo.12のプローブにDR*1106のクロス反応があることが、メーカーよりアナウンスされていないにもかかわらず、No.12に陽性反応を示した施設は判定表どおりにDR*1104と判定し、判定結果に不一致が発生してしまった(但し、最終結果は全てコンセンサスタイプと一致していた)。また、コンセンサスタイプのDR*1106に判定されていた施設についても施設番号15は、OD値1.69とカットオフ値は切っているもののクロス反応の傾向は見られた。施設番号42についてはOD値が完全に陰性であるため、当該施設に確認したところ、2000年4月期限切れのキットを使用しており、試薬の劣化が原因による偽陰性であると思われた。

本年8月にメーカーよりNo.12のプローブにDR*1106の特異性が追加されたが、今回のデータからOD値が2.0前後になることが多く、現

状のカットオフ値2.05ではクロス反応が弱い時に、偽陰性になることが考えられるため、カットオフ値の改良(低くする)も必要であると思われた。但し、No.12が偽陰性の場合でも、No.3とNo.6のプローブが陽性の場合、No.11かNo.12が陽性のパターンしかないため、判定ミスは回避できると考えられる。

7) HLA-DQ (表8)

施設番号42はNo.7のプローブが陰性で判定結果が不一致であったが、これも2001年11月切れのキットを使用しており、試薬の劣化が原因による偽陰性であると考えられた。

4. まとめ

1) 全体的にPCR-MPHは完成された試薬であり判定に問題はないが、本キット単独でのタイピン

- グには注意が必要であると思われる。
- 2) 判定に関して血清学的タイピングと同様に、プローブの反応性を把握しておく必要がある。
 - 3) 洗浄作業等テクニカルの面で影響を受けやすく、作業に若干の熟練が必要である。
 - 4) 試薬に関するプローブの特異性等メーカーから

のリアルタイムな最新情報の供給が求められる。

- 5) データをスコア化しているが、その規定が無いためにプローブの反応性が把握しずらく、スコア化の基準を規定する必要があると思われる。

シオノギHLA-DNAタイピングキットの評価

石井博之, 小野明子, 池田通代, 福森泰雄

大阪府赤十字血液センター

1. はじめに

シオノギHLA-DNAタイピングキットはマイクロプレートを使用したMRHA (microtiter plate reverse hybridization assay) 法を原理とする方法である。特徴としては、ハイブリダイゼーションを37℃で行うことができる。製品は、HLA-A, B, C, B40の4種類があり、HLA-A, Cがそれぞれ23プローブ、HLA-Bが31プローブ、HLA-B40が15プローブの構成となっている。解像度については、HLA-B40は全てのアリルを、HLA-A, B, Cは日本人で通常観察されるアリルの大部分をmedium/high resolutionで検出することが可能である。

2. 参加施設・方法

今回、データを提出された参加施設は7施設 (HLA-A, B, C : 3施設, HLA-A, B : 2施設, HLA-B, C : 1施設, HLA-A : 1施設) であった。ローカス毎では、HLA-Aが6施設, HLA-Bが6施設, HLA-Cが4施設の参加があり、各施設においてスコア化された各プローブの反応性データを中心に解析した。

3. 反応・判定結果

表1, 2, 3に各ローカスの反応と判定結果を示す。

1) HLA-A

Aローカスにおいては、アリルの表記法に違いがみられるものの、判定結果では施設間での相違はなかった。各プローブの反応性については、No.14, 15において若干弱い施設が複数あり施設間差がみられた。表記法においては、2桁で切っている施設、可能性のあるアリルを/で区切って表示する施設、キットの判定用プログラム (シオノギHLA-DNAタイピングシステム) で表示される最初の組み合わせで報告している施設があった。

2) HLA-B

Bローカスにおいては、Aローカスと同様に表記法に違いがみられたが、判定結果に相違はなかった。各プローブの反応性は、No.11, 18, 28のプローブが弱い施設が複数あり、No.12, 14, 27のプローブは全体的に弱い傾向があった。またNo.26のプローブにおいては、アリル特性があり、B44がある場合弱い傾向がみられた。

3) HLA-C

Cローカスにおいては、表記法の違い以外は特に問題はなかった。

4. まとめ

特に大きな問題点もなく、全体的には各ローカス

表1 HLA-A ローカスの反応スコアと判定結果

sample No.	施設番号	プローブNo.																							locus名
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
H1401	H14-17	8	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	6	1	1	8	1	8	1	8	8	8	0201/04/06/+
	H14-20	8	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	8	1	8	1	8	1	8	8	0201/04/06/+
	H14-36	8	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	8	1	8	1	8	1	8	8	0201/04/06/+
	H14-58	8	1	8	8	1	1	6	8	1	1	1	1	4	1	1	4	2	8	1	8	1	8	8	0201/04/06/+
	H14-59	8	1	8	8	1	1	6	8	1	1	1	1	8	1	1	6	1	8	1	8	1	8	8	0201/04/06/+
	H14-69	8	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	8	1	8	1	8	1	8	8	0201/04/06/+
H1402	H14-17	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	8	0101/02	
	H14-20	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	8	0101/02	
	H14-36	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	6	1	8	1	8	1	8	0101/02	
	H14-58	8	8	8	8	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	4	1	8	1	8	1	8	0101/02	
	H14-59	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	1	8	0101/02	
	H14-69	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	1	8	0101/02	
H1403	H14-17	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	1	2402/04/05/+	
	H14-20	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	1	8	2402/04/05/+	
	H14-36	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	1	8	1	2402/04/05/+	
	H14-58	8	8	8	8	1	1	1	8	2	1	1	1	1	1	1	4	1	8	1	8	1	8	2402	
	H14-59	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	1	8	1	2402/04/05/+	
	H14-69	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	1	8	1	2402/04/05/+	
H1404	H14-17	8	8	8	8	1	6	1	8	1	1	1	1	1	6	8	1	1	1	8	1	1	8	2402/04/05/+	
	H14-20	8	8	8	8	1	8	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	2402/04/05/+	
	H14-36	8	8	8	8	1	8	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	2402/04/05/+	
	H14-58	8	8	8	8	1	8	1	8	1	1	1	1	1	6	8	1	1	1	8	1	1	8	2402	
	H14-59	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	2402/04/05/+	
	H14-69	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	2402/04/05/+	
H1405	H14-17	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	
	H14-20	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	
	H14-36	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	
	H14-58	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	
	H14-59	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	
	H14-69	8	8	8	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	
H1406	H14-17	8	1	8	8	1	6	6	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	
	H14-20	8	1	8	8	1	8	8	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	
	H14-36	8	1	8	8	1	8	8	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	
	H14-58	8	1	8	8	1	8	8	6	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	
	H14-59	8	1	8	8	1	8	8	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	
	H14-69	8	1	8	8	1	8	8	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	1	8	1	1	8	0201/04/06/+	

表2 HLA-B ローカスの反応スコアと判定結果

sample No.	施設番号	プローブNo.																														locus名				
		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			
H1401	H14-17	1	1	8	1	1	1	1	1	8	6	1	6	8	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1	8	1	8	8	8	1	1	1	8	1517		
	H14-20	1	1	8	1	1	1	1	1	8	8	1	8	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	8	8	1	1	1	1	8	1517		
	H14-36	1	1	8	1	1	1	1	1	8	8	1	6	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	8	8	1	1	1	1	8	1517		
	H14-59	1	1	8	1	1	1	1	1	8	8	1	6	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	1	4	8	1	1	1	1	8	1517	
	H14-61	1	1	8	1	1	1	1	1	8	8	1	6	8	1	1	1	1	1	1	1	4	1	8	1	8	8	8	1	1	1	1	1	8	1517	
	H14-69	1	1	8	1	1	1	1	1	8	8	1	6	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	8	1	8	8	1	1	1	1	8	1517	
H1402	H14-17	8	1	6	1	1	1	1	1	8	1	8	8	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	8	2701/02/03/+			
	H14-20	8	1	8	1	1	1	1	1	8	1	8	8	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	8	2701/02/03/+			
	H14-36	6	1	6	1	1	1	1	1	8	6	1	6	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	6	1	1	6	1	8	2701/02/03/+		
	H14-59	6	1	8	1	1	1	1	1	8	6	1	6	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	6	1	1	6	1	1	8	2701/02/03/+	
	H14-61	8	1	4	1	1	1	1	1	8	4	1	8	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	8	2701/02/03/+		
	H14-69	8	1	8	1	1	1	1	1	8	8	1	6	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	8	27		
H1403	H14-17	1	8	1	1	1	1	1	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	2	1	8	4002/03	
	H14-20	1	8	1	1	1	1	1	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	4002/03	
	H14-36	1	8	1	1	1	1	1	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	4002/03	
	H14-59	1	8	1	1	1	1	1	1	8	6	1	1	8	6	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	6	1	1	4	1	1	6	4002/03	
	H14-61	1	8	1	1	1	1	1	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	8	4002/03	
	H14-69	1	8	1	1	1	1	1	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	8	4002/03	
H1404	H14-17	1	1	1	8	1	1	1	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	4403	
	H14-20	1	1	1	8	1	1	1	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	4403	
	H14-36	1	1	1	8	1	1	1	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	8	4403	
	H14-59	1	1	1	8	1	1	1	1	8	6	1	1	8	6	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	4	1	1	4	1	1	1	8	4403
	H14-61	1	1	1	8	1	1	1	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	4	1	1	4	1	1	1	8	4403
	H14-69	1	1	1	8	1	1	1	1	8	8	1	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	4403
H1405	H14-17	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	8	4601	
	H14-20	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	8	4601	
	H14-36	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	8	4601	
	H14-59	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	4601
	H14-61	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	4	4601
	H14-69	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	4601
H1406	H14-17	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1501/05/06/+	
	H14-20	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1501/26N/27/+
	H14-36	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1501/26N/27/+
	H14-59	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1501/05/06/+
	H14-61	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1501/05/06/+
	H14-69	1	1	8	1	1	1	1	1	8	1	1	1	8	1	1	1	1	1	1	1	8	1	1	8	1	1	8	1	1	1	1	1	1	8	1501/26N/27

表3 HLA-C ローカスの反応スコアと判定結果

sample No.	施設番号	プローブNo.																							locus名	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
H1401	H14-20	8	1	1	1	8	8	1	8	1	8	8	1	8	1	1	8	1	1	8	1	8	1	1	0701/02/03/+	1203/1604
	H14-36	8	1	1	1	8	8	1	6	1	6	8	1	8	1	1	8	1	1	8	1	6	1	1	0701/02/03/+	1203/1604
	H14-61	8	1	1	1	8	8	1	8	1	8	8	1	8	1	1	8	1	1	8	1	6	1	1	07	1203
	H14-69	8	1	1	1	8	8	1	8	1	8	8	1	8	1	1	8	1	1	8	1	8	1	1	07	1203/1604
H1402	H14-20	8	1	8	1	1	8	8	1	8	8	1	1	8	1	1	8	1	8	1	8	1	1	02021/022/024	0304	
	H14-36	8	1	8	1	1	8	6	1	6	8	1	1	8	1	1	8	1	8	1	8	1	1	0202	0304	
	H14-61	8	1	8	1	1	8	8	1	8	8	1	1	8	1	1	8	1	8	1	8	1	1	0202	0304	
	H14-69	8	1	8	1	1	8	8	1	8	8	1	1	8	1	1	8	1	8	1	8	1	1	0202	0304	
H1403	H14-20	8	8	8	1	1	1	8	8	1	8	1	8	8	1	1	8	1	8	1	8	1	1	0102/03	0304	
	H14-36	8	8	8	1	1	1	8	8	1	8	1	8	6	1	8	1	8	1	8	1	8	1	0102/03	0304	
	H14-61	8	8	8	1	1	1	8	8	1	8	1	8	8	1	8	1	8	1	8	1	8	1	0102/03	0304	
	H14-69	8	8	8	1	1	1	8	8	1	8	1	8	8	1	8	1	8	1	8	1	8	1	0102/03	0304	
H1404	H14-20	8	8	1	8	1	1	8	8	1	1	1	8	8	1	8	1	1	8	1	8	1	1	0102/03	1403	
	H14-36	8	8	1	8	1	1	8	8	1	1	1	8	8	1	8	1	1	8	1	8	1	1	0102/03	1403	
	H14-61	8	8	1	8	1	1	8	8	1	1	1	8	8	1	8	1	1	8	1	8	1	1	0102/03	1403	
	H14-69	8	8	1	8	1	1	8	8	1	1	1	8	8	1	8	1	1	8	1	8	1	1	0102/03	1403	
H1405	H14-20	8	8	1	1	1	8	1	8	8	1	1	8	8	1	8	1	1	8	1	8	1	1	0102/03	1202	
	H14-36	8	8	1	1	1	8	1	8	8	1	1	8	8	1	8	1	1	8	1	8	1	1	0102/03	1202	
	H14-61	8	8	1	1	1	8	1	8	8	1	1	8	8	1	8	1	1	8	1	8	1	1	0102/03	1202	
	H14-69	8	8	1	1	1	8	1	8	8	1	1	8	8	1	8	1	1	8	1	8	1	1	0102	1202	
H1406	H14-20	8	1	8	1	1	1	8	8	1	1	8	1	1	8	8	1	8	1	8	1	1	1	0303	1502/03/04/+	
	H14-36	8	1	8	1	1	1	8	8	1	1	8	1	1	8	8	1	8	1	8	1	1	1	0303	1502/03/04/+	
	H14-61	8	1	8	1	1	1	8	8	1	1	8	1	1	8	8	1	6	1	1	1	1	1	0303	15	
	H14-69	8	1	8	1	1	1	8	8	1	1	8	1	1	8	8	1	8	1	8	1	1	1	0303	15	

ともに良好な成績であった。AおよびBローカスで一部のプローブに見られた施設間差は、手技や使用している装置等によるものと思われる。また反応性の低い傾向のプローブやアレル特性のあるプローブもみられたが、判定に支障をきたすものではなかった。各施設ともに発色不良やfalse positive等によるタイピングミスも無く正確にタイピングされていた。判定結果の表記法については、QCの場合、解釈によっては不一致と判断される可能性もあり、「アレル表記法と結果報告の原則について2000」に則した表記に統一して結果報告することが望ましい。

PCR-RFLP法の解析

烏谷竜哉, 竹内潤子, 奥山正明

愛媛県立衛生環境研究所, 疫学情報科 (臓器移植支援センター)

1. はじめに

PCR-RFLP法は、HLA領域においてDNAタイピングの普及が始まった当初から簡便で高精度な結果が再現性よく得られることから、自家調整も含めて多くの研究室や検査室で利用されてきた。しかし、WHOのHLA命名委員会で公認されるアリル数は年々飛躍的に増加し、PCR-RFLP法でアリルレベルのタイピングに対応するには、随時プライマーや使用する制限酵素を更新していく必要がある。今回、RFLP法を実施した各施設の協力により、それぞれの施設での問題点や方法を比較検討することができたので、QCの報告結果と併せて解析する。

2. 参加施設・方法

ローカス別の使用施設数を表1に示した。PCR-RFLP法はQCの結果報告の際に生データの回収が困難なため、今回すべてのRFLP法使用施設に対して、RFLP法単独での解析結果、誤判定の原因、問題点、使用プライマー、制限酵素等について郵送にて調査を行った。

クラスIのタイピングを実施した施設が4施設あったが、少数のため今回の解析からは除外した。

3. タイピング結果及び誤判定の要因

DRB1及びDQB1におけるRFLP法のタイピング結果を、各施設から報告された表記別に集計してそれ

ぞれ表2及び表3に示した。なお、DQA1及びDPB1については特に問題なく回答されていたので省略した。

RFLP法は自家調整で使用している施設が多いが、それぞれの施設で使用プライマーや制限酵素の組み合わせが異なることに加え、解析に使用している判定表が何時のNomenclatureアリルに対応しているかによって見かけ上の解像度が著しく異なるため、各施設のタイピング結果を比較する際には十分な注意

表2 PCR-RFLP法によるDRB1のタイピング結果

サンプル	アリル 1		アリル 2	
	タイピング結果	施設数	タイピング結果	施設数
#1401	0102	19	1202	19
	0102	18	1202	16
	01	1	12021	2
			12	1
#1402	0404	19		
	0404	12		
	0404/23/32	3		
	0404/13/23/32/37/42	1		
	0404/23/40	1		
#1403	0405	19	1106	19
	0405	12	1106	4
	0405/24/28/29/30	3	11	4
	0405/09/24/29/30	1	1104/06	3
	04051/053	1	1103/04/06	3
	04051	1	1104/06/34/38/42	1
	04	1	1103/04/06/25	1
			1104/06/38/+	1
			1103/04	1
			1104	1
#1404	0405	19	1302	20
	0405	12	1302	16
	0405/24/28/29/30	3	13	2
	0405/09/24/29/30	1	13021	1
	04051/053	1	1302/23/30/31/34	1
	04051	1		
#1405	0803	18	0901	15
	0803	12	0901	12
	08032	4	09012	2
	08032/10/12/14/18	1	09	1
	08	1		
#1406	0405	19	0406	19
	0405	11	0406	16
	0405/09/24/28/29/30	2	0406/20	1
	0405/24/28/29/30	2		
	04051	2		
	0409	1		
	04	1		
(0410)	3	(0420)	3	
(0411/17)	1	(0419/21)	1	

表1 PCR-RFLP法の使用施設数

ローカス	参加数	RFLP 使用施設		キット別使用施設数		
		施設数	利用率	自家製	DRLab	SMITEST
DRB1	75	20	27%	12	3	5
DQB1	47	16	34%	13	2	1
DPB1	14	14	100%	9	2	3
A,B,C	71	4	6%	4	0	0

が必要である。

(1)DRB1

一般的にグループ特異的PCRが使用されているが、DR4グループやDR52関連グループでは増幅されるアリルが多いため、他のグループと比べて解析が複雑となる傾向にある。今回のサンプルでは#1402のDRB1*0404, #1403, #1404, #1406のDRB1*0405, #1403のDRB1*1106においてambiguityの報告が多く見られた。特に#1406のDRB1*0405, *0406ヘテロ接合体は、制限酵素の組み合わせ次第では同じRFLPパターンとなるアリルペアが存在する (DRB1*0410,*0420及び*0411, *0419) ので、Sac II +Hph I やHae II +Hph I 等の追加の制限酵素処理が必要となる。

今回の誤判定は、#1403のDRB1*1106を*1103/04あるいは*1104と報告した施設がそれぞれ1施設あった。*1106と*1104は通常では区別する制限酵素がないので1104/06と報告すべきであり、表記上のミスと言える。また、DRB1*0405を*0409と判定した原因は、制限酵素Mnl I でのバンドパターンの読み間違いと推察される。

(2)DQB1

#1405においてDQB1*0303を*0301と報告した施設が1施設あった。原因はRFLPのバンドサイズを正確に読んだにもかかわらず、判定表をずらして見ってしまったという初歩的なミスであった。

また、DQB1の一部のアリル (DQB1*0201/02, *0301/09等) はexon3を解析する必要がある。#1401や#1403のDQB1*0301ではほとんどの施設が*0301と回答しているが、実際にexon3を確認して*0309を否定しているかは不明である。

4. 誤判定の原因及びRFLP法の問題点と利点

各施設が経験した誤判定の原因と、RFLP法の問題点、利点を集計した結果を表4に示した。誤判定の原因として最も大きなものは、制限酵素の失活等の管理ミスであり、失活によって生じるpartial digestionを含めると7割以上の施設が経験していた。問題点とも重複するが、近接しているバンドの区別にはある程度慣れが必要であり、各酵素の特性を把握することの重要性を多数の施設が指摘していた。

表 3 PCR-RFLP 法による DQB1 のタイピング結果

サンプル	アリル 1		アリル 2	
	タイピング結果	施設数	タイピング結果	施設数
#1401	0301	16	0501	16
	0301	13	0501	15
	03011	1	05011	1
	0301/09	1		
	0301/09/10/+	1		
#1402	0302	16		
	0302	15		
	0302/07/08	1		
#1403	0301	15	0401	15
	0301	12	0401	15
	03011	1		
	0301/09	1		
	0301/09/10/+	1		
#1404	0401	16	0604	16
	0401	16	0604/09	8
			0604	5
			0603/04/05/06	1
			0604/09/12	1
			06	1
			0601	16
#1405	0303	16	0601	16
	0303	10	0601	15
	03032	5	06011	1
	0301	1		
#1406	0302	16	0401	16
	0302	15	0401	16
	0302/07/08	1		

表 4 誤判定の原因, 問題点, 利点

(1) 誤判定の原因 (16 施設)	施設数
・制限酵素の失活等の管理ミス	7
・partial digestion (star 活性等)	5
・バンドの読み間違い(初歩的なもの)	4
・バンドが近接している場合の区別が困難	4
・転記ミス	2
・分注ミス	2
・Mnl I 等、サイズを読み取りにくい酵素がある	2
・非特異バンドの存在等	1
・判定表の見間違い	1
・反応液のコンタミネーション	1
・New allele 或いは稀少 allele の切断パターンが不明	1
(2) 問題点 (22 施設)	施設数
RFLP 全全般	
・塩基変異場所を認識する酵素が必要→アリル判定に限界	8
・バンドが近接していると判定が困難	6
・大量検体に向かない(労力が大きい)	6
・制限酵素の特性を把握する必要がある (特に additional な酵素で熟練が必要)	3
・時間がかかる	2
・切断されないパターンの場合、酵素の活性が不安	2
・プライマー部分や増幅領域外の解析が必要なアリルが増加	1
・特になし	1
自家製	
・制限酵素のクオリティの管理が難しい	5
・アリルの増加に伴い、制限酵素の種類が増える	2
・自家製では allele の更新が手間	1
キット	
・酵素が増えないので、新しいアリルへの対応が難しい	2
・メーカー側の new allele に対する対応が遅い	1
・キットが高価	1
(3) 利点 (16 施設)	施設数
RFLP 全全般	
・操作が簡単(専用の機器が不要、Generic タイピングが簡便)	6
・検査結果が明瞭(FP, FN がない)	3
・少〜中規模の検体処理効率が良い	2
・再現性に優れている	1
自家製	
・安価	4
・PCR 産物を他法 (SSCP, SBT) に応用できる	2
・解像度を目的に応じて変更可能	2
・4析の解析ができる(?)	2
キット	
・キット化されているため判定も比較的容易(パターン解析)	1
・キットの場合、プライマーや制限酵素の品質が保持され安心	1

最も避けなければならないのは、バンドサイズを読み間違えたり判定表を見間違えたりする単純ミスであり、複数の職員で確認する等の対策が必要と考えられた。

その他の問題点としては、塩基配列の変異場所を認識する制限酵素が必要なためRFLP法を用いたアレル判定の限界を多数の施設が指摘していた。また、自家製ではアレルの増加に伴い制限酵素の種類が増加して管理が一層難しくなるのに加え、判定表の更新作業も重荷になるが、キットに対しては新しいアレルへの対応に不満があるようであった。

一方RFLP法の利点としては、特殊な機器を必要とせず操作が単純で検査結果が明瞭であるということ、また、検査の目的に応じて解像度の調整が容易であり4桁を目指す場合には増幅産物を他法に利用できること、そして自家製では安価であることが重要なポイントであった。一方、キット化によるメリットも複数の施設から指摘された。

5. 各施設で使用するプライマー及び制限酵素

本法は自家調整が容易なため、キットを使用せず各施設独自の方法で解析している場合が多い。そこで、他施設の方法を知ること互いの検査精度を向上させることが可能と考え、プライマーの設定や制限酵素の選択等について調査を行った。特に問題のあったグループについてのみ以下に述べる。

(1) DRB1*01

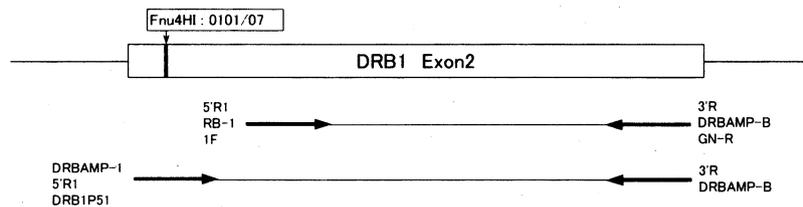
センスプライマーは大きく分けて2種類のプライマーが使用されていたが(図1)、いずれを用いても解析の精度に差はないと考えられた。

DRB1*0101と*0107とは

Fnu4H I (BsoF I)で区別可能であるが、両プライマーとも多型部位を増幅できないため現実には区別できない。この多型部位の上流にはDR1に特有のモチーフがないので、*0101/07が解析可能なDR1特異的PCRは困難と考えられる。

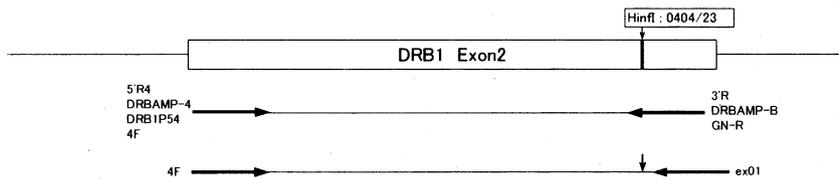
(2) DRB1*04

すべての施設がほぼ同じプライマーを使用していたが、解析対象とするNomenclatureが新しいほど多くの制限酵素を使用していた(図2)。DRB1*0404と*0423は通常のアンチセンスプライマーでは区別できないが、多型部位の下流側に設計したプライマー(ex01)を追加して解析している施設があった。また、DR4グループは解析対象アレルが多く、ヘテロ接合体の解析が困難となるため、2種類のアンチセンスプライマーで2つのグループに分けて解析す



	センスプライマー	アンチセンスプライマー	制限酵素	施設数
1	5'R1 GGGTTGCTGGAAAGATGCATCT	3'R CCGCTGCACCTGTGAAGCTCT	AvaII,PstI,HphI	3
	RB-1 GGGTTGCTGGAAAGATGCATCT	DRBAMP-B CCGCTGCACCTGTGAAGCTCT	AvaII,PstI PstI,MnlI,HphI	1 3
2	1F TGCGGTTGCTGGAAAGTTG	GN-R GCCGCTGCACCTGTGAAGCTCT	FokI,PstI,HphI MnlI,HphI,PstI,SacII	1 1
3	DRBAMP-1 TTC TTGTGGCAGCTTAAGTT	DRBAMP-B CCGCTGCACCTGTGAAGCTCT	AvaII,PstI	2
4	5'R1 TTGTGGCAGCTTAAGTTGAAT	3'R CCGCTGCACCTGTGAAGCTCT	AvaII,PstI	1
5	DRB1P51 TTC TTGTGGCAGCTTAAGTTGAA	DRBAMP-B CCGCTGCACCTGTGAAGCTCT	HphI,Sau96I	1

図1 DRB1*01 グループの PCR-RFLP



No.	センスプライマー	アンチセンスプライマー	制限酵素	施設数
1	5'R4 DRBAMP-4 GTTTCTTGGAGCAGGTTAAAC	3'R DRBAMP-B CCGCTGCACCTGTGAAGCTCT	SacII,AvaII,HinfI,HaeII,HphI,MnlI HhaII,HinfI,SacII,HphI,MnlI (FokI,BsrBI)	7 3
	DRB1P54 CGTITCTTGGAGCAGGTTAAAC	DRBAMP-B CCGCTGCACCTGTGAAGCTCT	HinfI,SacII,Cfr13I,HhaI,RsaI,HphI(AciI,Tsp45I,SfaNI, BsrI,NlaIV,Hsp92II,MnlI) HaeII,SacII,HinfI,HphI,MnlI	1 1
2	4F CGTITCTTGGAGCAGGTTAGAC	GN-R GCCGCTGCACCTGTGAAGCTCT	Fnu4HI(BsoFI),HhaI,MnlI,HphI,RsaI	1
3	op 4F CGTITCTTGGAGCAGGTTAGAC	ex01 GCTCACCTCGCCGCTGCACT	HaeII,SacII,AvaII,HinfI,HphI,MnlI (FokI,DdeI,ApaI, Sau96I,BsrI, BsrBI,HinP1I,RsaI,Tsp45I,AciI,SfaNI)	1
5	5'R4 GTTTCTTGGAGCAGGTTAAAC	3'R86V CTGCACCTGTGAAGCTCTCAC	HinfI (0404/23)	1
		3'R86G CTGCACCTGTGAAGCTCTCCA	(0401,0405,0407) 27allele (0403,0404/23,0406,0410) 23allele	1

図2 DRB1*04 グループの PCR-RFLP

る施設があった。

(3)DRB1*03, *08, *11, *12, *13, *14

エクソン2ではDR52関連抗原を1つのグループとして増幅する方法が主流であるが(図3), 特にヘテロ接合体の解析を容易にするため, Hph I の認識部位にプライマーを設計して2あるいは4つのグループに分割して増幅する方法を採用する施設があった(図4)。DRB1*1201と*1206の区別にはエクソン3の解析が必要となるが, エクソン3のジェネリックプライマーを設計している施設が1施設あった。

(4)DRB1*07

DRB1*0701/03/04/05/06の5種類のアリルが報告されている現在では, 複数の制限酵素で解析を行わないと4桁の結果は得られない。特に, 5施設が使用している5'R7では*0701と*0703の置換部位を増幅できないので他のプライマーへの変更が必要である(図7)。

(5)DRB1*09

DRB1*09012, *0902の2種類のアリルが報告されているにもかかわらず, 制限酵素を使用していない施設が複数見られた。これらのアリルを区別するためには, 増幅後Rsa I やDde I で解析する必要がある。

(6)DQB1

各施設共通してDQB1*05, *06及び*02, *03, *04の2つのグループに分けて増幅しているが, センスプライマーには各施設で異なるプライマーが使用されていた。このうち, GH28及びGH28NLはエクソン部分の比

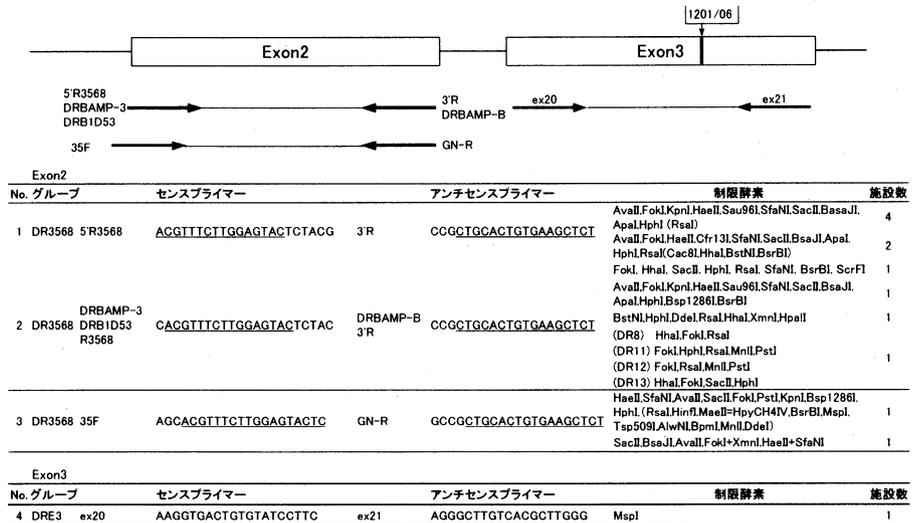


図3 DRB1*03,*08,*11,*12,*13,*14グループのPCR-RFLP(1)

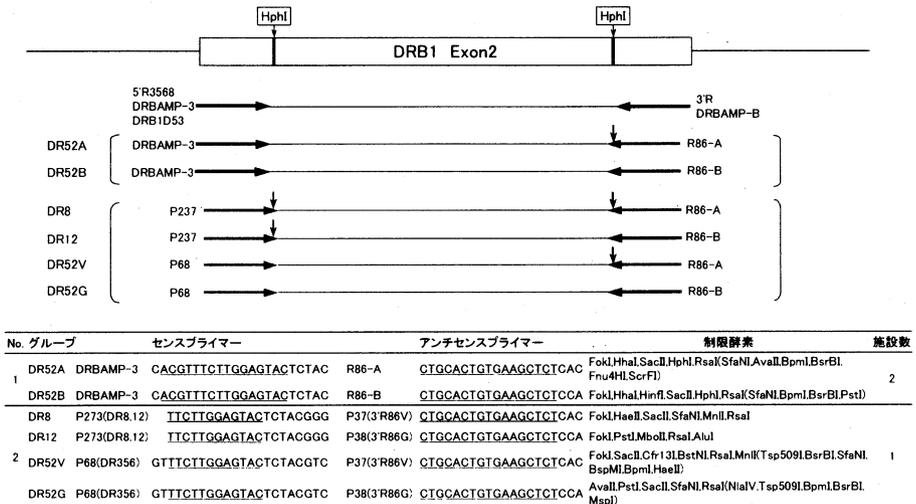


図4 DRB1*03,*08,*11,*12,*13,*14グループのPCR-RFLP(2)

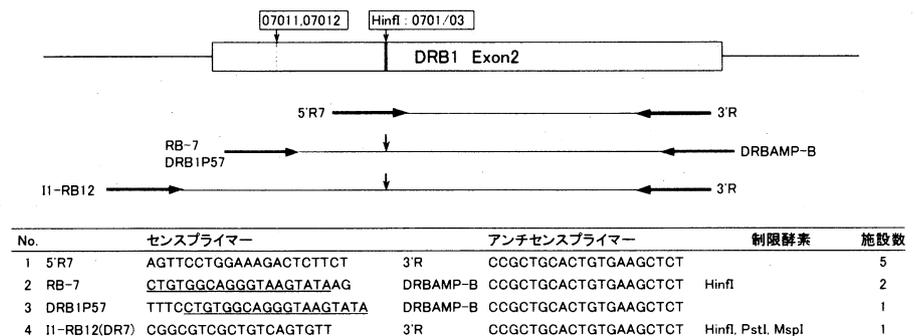


図5 DRB1*07グループのPCR-RFLP

較的内側に設計されているため, *0602, *0603, *0609及び*0302, *03032に区別できないアリルが存在する(図6)。4桁の結果を求める場合, より

上流側に設計されたプライマーに変更すべきである。

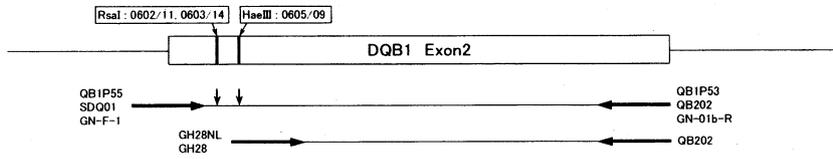
また、DQB1*0201/02及び*0301/09の区別にはエクソン3の解析が必要となる(図7)。SSP法を併用する施設も多いが、RFLP用のプライマーを設計している施設が2施設あった。

(7)DPB1

1つのグループとして増幅する施設が4施設、2あるいは4つのグループに分割して増幅する施設がそれぞれ3施設、1施設であった(図8)。いずれの方法でもほとんどのアレルが問題なく解析できると考えられた。

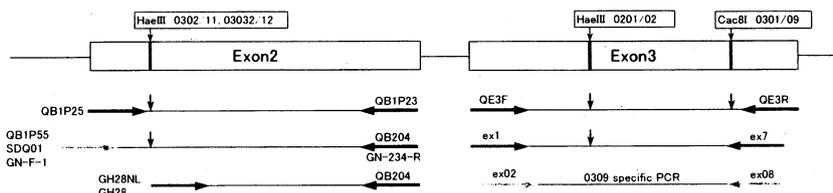
6. まとめ

近年のアレル数の飛躍的な増加に伴い、HLAタイピングは複数の方法を併用してはじめて高精度の結果が得られるようになってきた。RFLP法を用いて詳細な解析を行うには定期的なデータの更新等かなりの労力が必要となるが、タイピングの目的によって要求される精度は異なるので、RFLP法の限界を理解し、数あるタイピング法の1つの選択肢として使用すべきである。



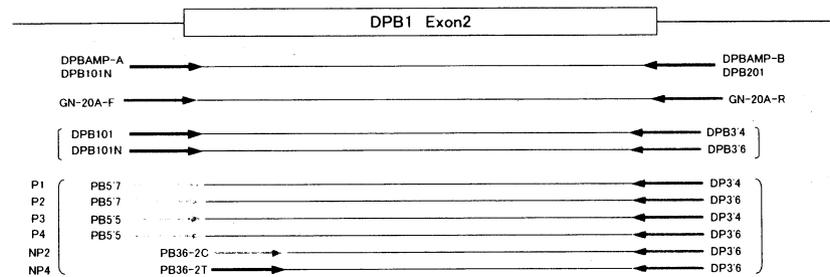
No.	センスプライマー	アンチセンスプライマー	制限酵素	施設数
1	QB1P55 GATTCCCGCAGAGGATTTTCG	QB1P53 TCCCGCGGTACGCCACCTC	BsaHI, HaeIII, HhaI, RsaI (Fnu4HI)	4
2	QB1P55 GATTCCCGCAGAGGATTTTCG	QB202 CACCTGCAGATCCCGCGGTACGCCACCTC	FokI, ApaI, HaeIII, SfaNI, BsmFI, HphI, RsaI	1
3	SDQ01 AGGGATCCCGCAGAGGATTTTCGTG	QB202 CACCTGCAGATCCCGCGGTACGCCACCTC	FokI, ApaI, HaeIII, SfaNI, BsmFI, DraIII, HphI, HaeIII, RsaI, HpaII	2
4	SDQ01 AGGGATCCCGCAGAGGATTTTCGTG	QB202 CACGGCAGATCCCGCGGTACGCCACCTC	RsaI, HhaI, HaeIII (BsmFI, SfaNI, BsaHI, Tsp45I, Fnu4HI, ApaI, MspI, AclI)	1
5	GN-F-1 CGGTGATTCCTCCGACAGAGGATTTTCG	GN-01b-R CCGCGGGAACGCCACCTCTGTGATT	BsaHI, HaeIII, HhaI, RsaI, DraIII, BsmFI	1
6	GH28NL GCATGTGCTACTTACCAACG	QB202 CACCTGCAGATCCCGCGGTACGCCACCTC	SfaNI, BsmFI, BsmFI, BsmFI, HaeIII, BsaHI, MspI, HaeIII, RsaI (BstI, Tsp45I)	1
7	GH28 CTCGGATCCGCATGTGCTACTTACCAACG	QB202 CACGGCAGATCCCGCGGTACGCCACCTC	FokI, HaeIII, HhaI, RsaI, BsaHI, AvaII	3

図6 DQB1*05,*06グループのPCR-RFLP



Exon2		Exon3			
No.	センスプライマー	アンチセンスプライマー	制限酵素	施設数	
1	QB1P25 GGATTTTCGTGTCACAGTTTAAGG	QB1P23 GTCGTGGGAGCTCCAACCTG	BsaHI, HaeIII, HhaI (Sau96I=Cfr13I)	4	
2	SDQ01 AGGGATCCCGCAGAGGATTTTCGTG	QB204 CACCTGCAGATCCCGGAGCTCCAACCTGGTA	FokI, SacI, AvaII, HinfI, HpaII	2	
3	QB1P55 GATTCCCGCAGAGGATTTTCG	DQ202 CACCTGCAGTCCCGGAGCTCCAACCTGGTA	BsaHI, HaeIII, HhaI (RsaI, AclI, BsmFI, MbolI, Cfr13I)	1	
4	GN-F-1 CGGTGATTCCTCCGACAGAGGATTTTCG	GN-234-R CCGTGGGAGCTCCAACCTGGTATT	BsaHI, HaeIII, HhaI, RsaI, AclI	1	
5	GH28NL GCATGTGCTACTTACCAACG	QB204 CACCTGCAGTCCCGGAGCTCCAACCTGGTA	FokI, BglI, SacI, BsaHI, BsaHI, HpaII	1	
6	GH28 CTCGGATCCGCATGTGCTACTTACCAACG	QB204 CACCTGCAGTCCCGGAGCTCCAACCTGGTA	SfaNI, BsmFI, BsmFI, BsmFI, HaeIII, BsaHI, MspI, HaeIII, RsaI (AclI)	1	
Exon3					
1	OE3F GGAGCCCGCAGTGCACATC	OE3R TCACAGTGGGAGGTGTAGA	HaeIII, CaeBI (MbolI, MnlI, MspI)	1	
2	ex1 TGGAGCCACAGTGCACATC	ex7 GTGGCAGGTGTAGACGTCTC	HaeIII	1	
3	ex02 ACAGTGCACATCTCCCGATC	ex08 CACGTGGCAGGTGTAGACCG	0301	1	
			0309		

図7 DQB1*02,*03,*04グループのPCR-RFLP



No. group	センスプライマー	アンチセンスプライマー	制限酵素	施設数
1	DPBAMP-A CCTCTCCCGCAGAGAATTAC	DPBAMP-B AGCCCTCACTCACCCTGGCGG	ApaI, BstNI, BstUI, DdeI, EcoNI, FokI, RsaI, SacI	2
2	DPB101N GTGAAGCTTTCCCGCAGAGAATTAC	DPB201 CACCTGCAGTCACTCACCCTGGCGGTG	BspI, BsmFI, BsmFI, Sau96I, DdeI, EcoNI, FokI, RsaI, BsrBI, DdeI, FokI, BstUI, EcoNI, BspI, BsmFI, BsmFI (BbvI, BstNI, ScaI)	1
3	GN-20A-F CCCCTCCCGCAGAGAATTAC	GN-20A-R CAAAGCCCTCACTCACCCTGG	BspI, BsmFI, BsmFI, Sau96I, DdeI, EcoNI, FokI, RsaI (BsrBI, BstNI, BstUI, PstI, MspI, MaeII, HpyCH4IV, MnlI, CaeBI, Fnu4HI, FnuI)	1
4	DPB101N GTGAAGCTTTCCCGCAGAGAATTAC	DPB34 CAGGGTCACGGCCTCGT	AvaII, SacI, DdeI, BsaJI, BstUI, EcoNI, RsaI, FokI	2
		DPB36 CTGCAGGTCATGGGCC	SacI, BsaHI, DdeI, FokI, BstUI, EcoNI, RsaI	
		DP34 CAGGGTCACGGCCTCGT	AvaII, SacI, BsmFI, DdeI, BsaJI, EcoNI, FokI, RsaI	
		DP36 CTGCAGGTCATGGGCC	AvaII, SacI, BsmFI, DdeI, EcoNI, FokI	
5	DPB101N GTGAAGCTTTCCCGCAGAGAATTAC	PB34 CAGGGTCACGGCCTCGT	FokI, BstUI, EcoNI, RsaI, BbvI, SacI, DdeI, BsaJI	
P1	PB57 CTCCCGCAGAGAATTACGCTG	PB34 CTGCAGGTCATGGGCC	FokI, BstUI, EcoNI	
P2	PB57 CTCCCGCAGAGAATTACGCTG	PB36 CTGCAGGTCATGGGCC	FokI, BstUI, EcoNI, DdeI	
P3	PB55 CCGCGCAGAGAATTACCTTTT	PB34 CAGGGTCACGGCCTCGT	FokI, BstUI, EcoNI, DdeI	
P4	PB55 CCGCGCAGAGAATTACCTTTT	PB36 CTGCAGGTCATGGGCC	FokI, BstUI, EcoNI, RsaI, ScaI, SacI, DdeI, MnlI	1
NP2	PB36-2C AACCGGGAGGAGTIA TCGC	PB36 CTGCAGGTCATGGGCC	EcoNI, DdeI, RsaI	
NP4	PB36-2T CAACCGGGAGGAGTIA TCGT	PB36 CTGCAGGTCATGGGCC	EcoNI, DdeI, ScaI, FokI, SacI, RsaI	

図8 DPB1のPCR-RFLP

SBT法の評価

河田寿子, 成瀬妙子

東海大学医学部, 分子生命科学系

1.はじめに

QCワークショップにおいて昨年初めての総合評価が行われた, Sequencing Based Typing (SBT)法の本年は2回目の報告である。自家製も含め, 近年発売された機械, 試薬などの積極的な使用報告があり, 本法は今後のさらなる普及に期待が持たれる所でもある。

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は表1にまとめた。参加施設数自体は昨年と同じであるが企業が1施設減り, 病院検査室が増加した。これはSBTに使用するシークエンサーについて, 安価なものが入手可能になったため導入されたと思われる。目的遺伝子は昨年と同様に, HLA-Bの使用を主とした, クラスIが中心になされていた。しかし, その使用目的はさまざまで, 通常の検査で使用している遺伝子座のみを解析した施設, また他法で判定されなかった検体のみを解析した, さらに通常は行わないがQCなので解析した, などQCをどのような形で施設が利用するかなどの意識の違いが表れていると感じた。

方法については, 各施設ごとに使用しやすいものを選んでいられると思われる。ここで区別をするならば, 自家製キットか, 判定ソフトを使用しているかないか, またキットについてはどの範囲まで解析しているかによって違いが表れるが, キット, 機械の詳しい解析については本誌にVGIとABIのSBT法の比較検討の報告があるので参照していただきたい¹⁾。

表1 参加施設・方法

1.参加施設数	12施設
内訳	
血液センター	5
大学・研究施設	3
企業	1
検査センター	1
病院検査室	2
2.SBT法を解析に用いた遺伝子座	
クラスI	
A,B,C遺伝子	3
A,B 遺伝子	8
B遺伝子のみ	1
クラスII	
DR,DQ遺伝子	1
DR,DP遺伝子	1
DRのみ	6
3.解析に使用した試薬について	
クラスI	
HLA Sequencing-Based Typing kit (ABI)	8
Allele SEQR (Forensic)	1
Gene kit HLA (VGI)	3
自家製	2
クラスII	
HLA Sequencing-Based Typing kit (ABI)	5
Allele SEQR (Forensic)	1
Gene kit HLA (VGI)	3
自家製	1

3.判定結果

昨年同様, 判定にSBTを使用している施設は, 用いていない施設に比べ高精度なタイピング結果の報告がなされ一致率も高かった。また標準化委員会で提唱されている表記法²⁾に従って報告されているので, 表記における混乱はほぼみられず, 一致率がさらに高まっていると感じた。今回の参加施設は前回とほぼ同様であったためか, 手技的なミスの減少も功を奏したと思われる。しかし, 今回の結果の中でプロトコール通りに行っているだけではSBT法で

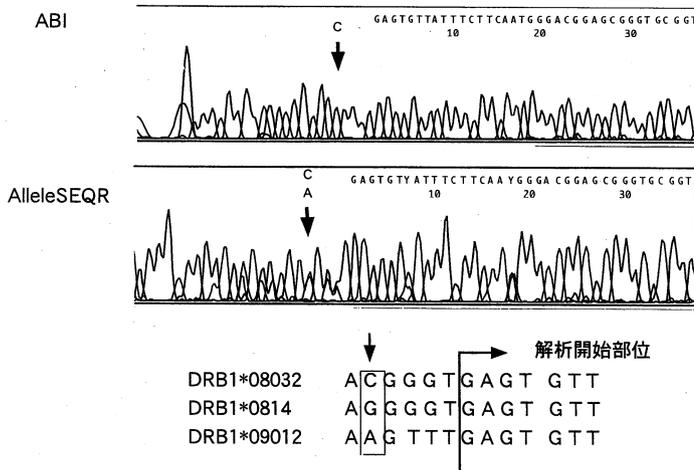


図1 DRB1*08032と*0814の判別

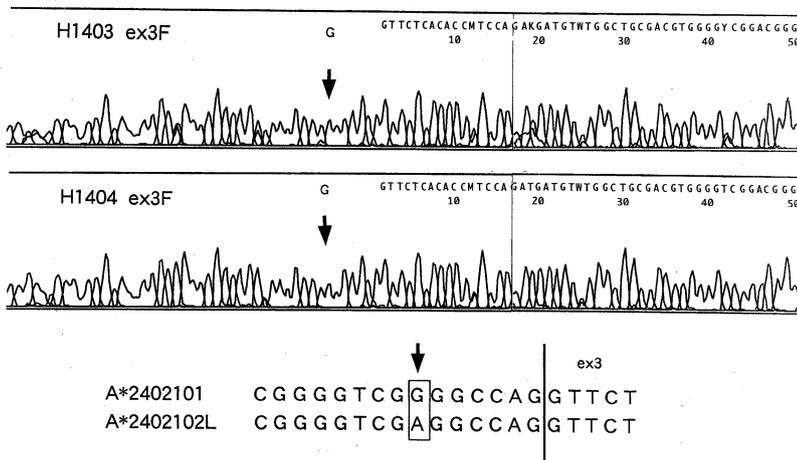


図2 A*2402101とA*2402102Lの判別

は決定できない対立遺伝子の存在がみられ、しかもそれは、シーケンスデータ上ではその違いが確認できるものであった。以下にその報告例を示す。

4.問題点

1) シークエンスデータと解析範囲

最初にDRB1遺伝子での解析結果について述べる。キット、自家製ともに、エクソン2のPCR産物でのシーケンス解析を行っている。自家製は市販の解析ソフトを使用していないことと、VGI-SBTは1施設のみを使用であることからここでの説明は除外する。

今回の検体H1405のDRB1遺伝子は、*0803と*0901のヘテロである。これをSBTで解析した場合

5桁表記の*08032、*09012となる。今回の回答例ではほとんどが5桁であったが、2施設でDRB1*0803/14の回答があった。使用試薬は、ABI 1施設、Forensic1施設であった。ABIのDRB1試薬は特異的Primerを使用しているためDR8とDR9は別々の産物を得ることができる。その場合はデータピークは1本しか出ないので判定ミスはないはずである。では、どのようなことが起こっているのか。

図1に実際の解析データを示した。上が特異的Primerを使用したABI社製の結果、下がDRB1を1組のPrimerで増幅したForensic社製での結果で、共にABI社の蛍光シーケンサーで泳動したのち、

ABI社のMatch Toolにて解析を行った。ここでシーケンスデータから塩基が削除されている部分がみられるが、これは解析ソフトがライブラリーの配列と照合するために、必要のない部分の情報を削除したためである。解析データの下にDRB1*08032と*0814、*09012の塩基配列を示したが、*08032と*0814の判別は解析開始部位から5塩基上流に存在するので、ソフト上では判別することができない。よって解析ソフトのみの結果を報告するのであれば、DRB1*0803/14は正解である。ソフト内でのライブラリーを確認したところ、2つの塩基配列情報は全く同一であった。しかし、実際のシーケンスデータは*08032と*0814を判別するに必要な部分は得られているので結果はDRB1*08032と回答するのが適切であると思われる。

次に昨年回答例で指摘のあったA*2402について報告する。

H1403、H1404、H1405のA遺伝子はA*2402を含むヘテロであるが、3施設でA*2402101と回答している。この対立遺伝子を特定するためには、イントロン部分のシーケンスを確認し、A*2402102Lとの判別を行わなければならない。実際のデータを図2に示した。これはABIのSBTキットのクラスI-Aエクソン3部分のシーケンスデータである。今回の組み合わせではエクソン3 Primer

setでのシーケンスに違いが表れている。クラス I の解析はエクソンのデータのみを使用しているの
で、示したデータも解析ソフトによってエクソン以
外の塩基が削除されている。しかしシーケンスで
はイントロン部分の配列も検出されており、エク
ソンから7塩基上流にその違いが存在する。今回はG
の塩基が確認され、A*2402101と判定された。こ
こで気をつけておくべきことだが、クラス I はエク
ソンの塩基配列が登録されているものがほとんど
で、イントロンの情報があるものは少ないことだ
る。今回はGがホモで確認されているため対立遺伝
子のイントロンの配列もGであることから判定し
ているが、イントロンの情報は確認されていない。
これらの例のようにSBT法の解析は、解析ソフトの範
囲外での判定も存在するということがある。

2) Ambiguityの扱いと記入方法

SBTは対立遺伝子の解析は容易だが、報告の記
入に迷うことがある。なぜならライブラリーに登
録された対立遺伝子名がそのまま結果として出て
くるからである。しかし本学会標準化委員会の提
唱する表記法の原則ができたため、本年は回答の
混乱は見られなかった。

だが、QCの報告用紙には判別できない対立遺
伝子に対するコメント欄が無いので別紙を添付し
た施設や、SBTの結果のみ別紙で報告した施設
もあった。さらにヘテロの対立遺伝子の組み合
わせに限りがある場合はどう報告するのかとい
った疑問も生じた。たとえばA/B, C/Dならば、
A-C, A-D, B-C, B-Dの4つの組み合わせが
考えられるが、SBTの解析結果よりA-C, B-D
の2つの可能性しかない場合にもやはりコメン
トが必要であろう。そして、SBTのみでは判
別できない対立遺伝子が存在するにもかかわらず
、遺伝子頻度を考慮して対立遺伝子を特定して
いた施設もあった。これもコメントが必要ではな
いだろうか。

5.まとめ

今回の報告は実際のデータより得られた問題
点を中心にまとめた。今後QCワークショップが
回数を重ねるにつれて、また異なる問題点が
でてくることが予想される。その時はまたこ
の場で討議し、より

正確な判定ができるように検討を重ねるべき
と考える。

他法においては日本人のタイピングをより
正確に検出できるキットの開発が望まれている。
その場合判定に重要なもの以外の対立遺
伝子候補の削除が考えられる。だがSBT法
は直接読んだ塩基配列が登録されている
すべての対立遺伝子にたいして照合され
る。よって、種類の増加や人種間にみ
られる頻度は無視して結果がだされて
くる。さらにライブラリーとして登
録されている対立遺伝子情報は塩基
配列の全長が示されていないものも
あるため、Ambiguityが増える可
能性がある。よって判定された遺
伝子候補数が他法と比較して多い
場合も考えられる。しかし、SBT
法は他法のキットでは検出できな
い塩基配列を正確に解析できる所
が、最大の利点である。この利
点を最大限に活用し、日本人の
正確なタイピングをする技術が
HLA認定技師に求められてくる
であろう。技術と知識の両方が
伴ってSBT法の良さが、より
発揮されると思われる。

参考文献

1. 吉川枝里, 中島舞子, 河田寿子他: Gnen Kit HLA sequencing Assay (VISIBLE社) と Sequencing based typing Kit (Applied Biosystems社) 法の比較検討. *MHC* 9:78-83, 2002.
2. 日本組織適合性学会HLA標準化委員会: アリル表記法と結果報告の原則について2000, *MHC* 7:131-132, 2000.