

第7回 HLA-QC ワークショップレポート

第7回 HLA-QC ワークショップレポート—経過—

木村彰方^{1,2)}, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林 賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾,
田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{1,2)}
(日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会)

- 1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, 2) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部ゲノム多様性研究室, 3) 信州大学医学部法医学, 4) 東京都赤十字血液センター検査部, 5) 防衛医科大学校検査部, 6) 国立佐倉病院 HLA 検査室, 7) 国立循環器病センター研究所, 8) 神奈川県赤十字血液センター検査部, 9) 東海大学医学部分子生命科学系, 10) 特定非営利活動法人 HLA 研究所

1. ワークショップ集会までの経過

今回で通産7回目を迎えたHLA-QCワークショップ(QCWS)は,昨年度に組織適合性技術者認定制度が設立されたことに伴って,標準化委員会の主催から認定制度委員会の主催に変更された。そのため,認定制度委員会の下部組織としてQCWS部会が設立され,QCWSの企画および実施を担当することとなった。平成15年2月にQCWS部会メンバー候補が選定され,今年度のQCWSの大まかな方針が討議された。

認定制度委員会の主催となったため,QCWSへの参加は個人単位とし,資料(DNAタイピング試料,QCWS集会配布資料など)費として2,000円を徴収した。平成15年3月にMHC誌上と学会ホームページ上にQCWS案内が出され,190名(77施設)から参加申し込みがあった。参加申し込み,参加者との連絡のいずれについても原則としてインターネットを利用(HPからの申し込み,電子メール連絡)することとして運営した。参加者数が確定した4月に,QCWS部会において,具体的なサンプルの選定,QCWSのテーマ(後述)の決定と電子媒体を用いたデータ収集の方法を決定した。ついで,5月中旬に施設単位としてサンプルを送付した。一部試料に不具合(DNAのdegradation)が観察されたため,5

月下旬に差し替えの2試料を含めて全サンプルを再送付した。平成15年7月25日をデータ送付締め切りとし,72施設から解析データが収集された。データは,フロッピーディスクで送付された5施設を除いて,メール添付で送付された。それらのデータを一括してMOに記録し,7月末に各解析担当者に送付され,8月末まで解析された。9月初旬に解析データを取りまとめ,QCWS集会で用いる資料を作成した。(表1)

また,7月末には全参加施設に対して,今回のQCWSの意図,各サンプルの内容,用いたサンプルのHLA-DNAタイプ(HLA-A,-B,-C,-DRB1,

表1 第7回 QCWSの実施経過

時期	実行内容
平成15年2月	QCWS立案、部会メンバー設定、学会員へのアナウンスメント(MHCとHP)
平成15年3月	参加申し込み受け付け(190名、77施設)
平成15年4月	QCWS部会(H15.4.17)にてサンプル選定、データ収集法を協議
平成15年5月中旬-下旬	QCWSサンプル発送、一部試料不良のため差し替え再発送
平成15年7月	データ締めきり(H15.7.25)
平成15年8月	データ解析(H15.8月末まで)
平成15年9月	QCWS集会実施(H15.9.15)

-DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1)を公表した。なお、公表時点ではTABのHLA-AをAnthony Nolanセルバンクの登録タイプであるA*0207としていたが、その後の検討でA*0201, *0207のヘテロ接合であることを確認したため、Anthony Nolanセルバンクに登録タイプの誤りを指摘し、修正を要望した。

2. QCWSのテーマ

組織適合性技術者認定制度の主旨にそったQCWSのテーマを設定することとして、今回のQCWSのテーマをQCWS部会で検討した結果、(1)正確なタイピング、(2)奇妙なデータが得られるタイピング、(3)少量DNAからのタイピングの3テーマとした。また、医療業務(臨床検査など)以外で行われるヒトDNA解析は、研究の範疇に入るため遺伝子解析ガイドラインに従って行わなければならないが、そのためには解析を行う各施設であらかじめそれぞれの倫理審査委員会に研究計画を申請し承認を受けて置く必要がある。このことは、昨年度まで実施されてい

たような、ボランティアから得られた血液DNAを多数の施設を対象として配布するQCWSを企画することが事実上不可能なことを示す。そこで今回のQCWSでは、遺伝子解析ガイドラインの対象外とされるヒトDNA(これまでによく研究され、学術的な価値が明らかであり、かつ研究者が容易に手に入れられるもの)を用いることとした。具体的には、国際HLAワークショップ解析で広く用いられ、種々の細胞バンクに登録されているBリンパ芽球様細胞株から抽出したDNAを用いた。(表2)

配布したサンプルは6種類であり、前記の(1)の目的で作製したH1501, H1502は、日本人由来ではない2種ずつの細胞株DNAを1:1で混合物したものである。また、(2)の目的では、癌(白血病を含む)などに稀に認められることのあるLOH(片側染色体上遺伝子の欠損)を模して2種類のDNAを10:1で混合したH1504を作製し、これと1:1混合のH1503の比較を行うこととした。一方、(3)の目的では、ろ紙にスポットした少量のDNAから、い

表2 DNAソースとなった細胞株とそのHLA型

Cell ID	Name	A	B	C	DRB1	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
1	AMALA	0217	1501	0303	1402	0503	0301	01	0402
2	MGAR	2601	0801	0701	1501	0102	0602	01	0401
3	WT47	3201	4402	0501	1302	0102	0604	01	1601
4	BM92	2501	5101	0102	0404	03	0302	01	0402
5	TAB	0201, 0207	4601	0102	0803	0103	0601	0202	0202
6	AKIBA	2402	5201	1202	1502	0103	0601	0201	0901

TABのHLA-Aは*0207としていたが、その後の解析で*0201, *0207のヘテロ接合であることが判明した。

表3 QCWSサンプルとそのHLA型

QC-ID	cell ID (ratio)	A	B	C	DRB1	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
H1501	1&2 (1:1)	0217, 2601	1501, 0801	0303, 0701	1402, 1501	0503, 0102	0301, 0602	01	0401, 0402
H1502	3&4 (1:1)	3201, 2501	4402, 5101	0501, 0102	1302, 0404	0102, 03	0604, 0302	01	1601, 0402
H1503	5&6 (1:1)	0201, 0207, 2402	4601, 5201	0102, 1202	0803, 1502	0103	0601	0202, 0201	0202, 0901
H1504	5&6 (1:10)	(0201, 0207), 2402	(4601), 5201	(0102), 1202	(0803), 1502	0103	0601	(0202), 0201	(0202), 0901
H1505	6	2402	5201	1202	1502	0103	0601	0201	0901
H1506	5&6 (1:1)	0201, 0207, 2402	4601, 5201	0102, 1202	0803, 1502	0103	0601	0202, 0201	0202, 0901

H1504の()は、タイピング方法によっては検出出来ないアレルを示す。

かなる方法を用いるとタイピングが行えるかを検討するものとした。(表3)

3. ろ紙からの DNA 抽出

ろ紙からの DNA 抽出を行っている施設はそれほど多くないことを想定して、以下の抽出プロトコールを作成し、サンプル配布時に添付した。なお、今回の QCWS で用いたろ紙は IsoCode (Schleicher & Schuell 社)であった。

1. 各ろ紙 (5 mm パンチ)に約 300 ng の DNA をスポットしたため、以下のプロトコールに従って、これを抽出する。
2. 火炎滅菌したピンセットでパンチを 1 枚取り出し、火炎滅菌したハサミ等を用いて 2 等分した後に、滅菌された 1.5 ml チューブに移す。
3. ろ紙の入ったチューブに 1000__ の滅菌 dH₂O を加え、軽く (3~5 秒程度)ボルテックスした後に、チューブを軽く遠心し spin-down した洗浄水を吸引除去(洗浄ステップ)。
4. 上記の洗浄ステップをもう一度くり返す。または、上記のろ紙をきれいなキムワイブ上で水切りした後に新しいチューブに移す。
5. チューブに 50__ の滅菌 dH₂O を加え、ろ紙片が完全に浸っていることを確認する。
6. 恒温槽やヒートブロックを使用し 90-95°C で 5 分加熱する。このステップで DNA が dH₂O に抽出される(抽出ステップ)。
7. 充分ボルテックス (30 秒~1 分程度)した後に spin-down。
8. 火炎滅菌したピンセットでろ紙を取り出すか、または新しい滅菌チューブに DNA 抽出液を移す。約 150 ng の DNA が回収される。

注意事項

#1: 抽出ステップについて: 抽出効率はこの条件の範囲ならあまり大きくは違わない。加熱温度、加熱時間の増加はむしろ抽出効率を落とすことがある。
#2: DNA 回収率について: ろ紙からの DNA 回収率は約 60% のため、約 150 ng の DNA が 50 μ l 中 (3 ng/ μ l) に回収されるものと予想される。1 回の PCR には 3-5 μ l (9-15 ng) 相当(但し、final reaction volume の 25% 程度まで)のサンプルを使用す

る。サンプル量を増やすと、PCR の阻害を生じることがある。

4. 参加者・参加施設

参加者は総数 190 名であり、以下の 77 施設に所属していた。参加者数、参加施設数とも昨年を上回った。

参加施設名

岩手医科大学附属病院、鷹揚郷腎研究所弘前病院、札幌市立札幌病院、北海道大学医学部附属病院、北海道赤十字血液センター、東京医科歯科大学難治疾患研究所、株式会社ベリタス、東京大学医学系研究科、東京都赤十字血液センター、東京女子医大腎臓病総合医療センター、(株)三菱化学ビーシーエル、株式会社ティエフビー、株式会社エスアールエル八王子ラボラトリー、北里大学医学部、横浜市立大学医学部附属病院、神奈川県赤十字血液センター、東海大学医学部附属病院、東海大学医学部、アボットジャパン株式会社、千葉県赤十字血液センター、国立佐倉病院、自治医科大学附属病院、有限会社ディーアールラボ、埼玉医科大学附属病院、埼玉医科大学総合医療センター、株式会社ビー・エム・エル、防衛医科大学校、富士重工業健康保険組合総合太田病院、長野県赤十字血液センター、信州大学医学部、静岡県立総合病院、静岡県立こども病院、名古屋第二赤十字病院、愛知県赤十字血液センター、岐阜赤十字病院、三重大学医学部附属病院、三重県赤十字血液センター、大阪血液センター、大阪府立病院、国立循環器病センター、シオノギ製薬(株)、関西医科大学病院、特定非営利活動法人 HLA 研究所、京都大学医学部附属病院、兵庫県赤十字血液センター、大阪市立大学医学部附属病院、松江赤十字病院、岡山県赤十字血液センター、広島赤十字センター、県立広島病院、湧永製薬(株)創薬研究所、山口県赤十字血液センター、香川県立中央病院、徳島大学医学部附属病院、高知県立中央病院、福岡大学医学部、福岡大学医学部、福岡赤十字病院、福岡県赤十字血液センター、佐賀県立病院好生館、長崎大学熱帯医学研究所、国立病院長崎医療センター、熊本県赤十字血液センター、大分県立病院、県立宮崎病院、金沢医科大学病院、石川県赤十字血液セン

ター，富山医科薬科大学附属病院，富山県赤十字センター，立川メディカルセンター立川総合病院，新潟市民病院，新潟県赤十字血液センター，株式会社ゲノムサイエンス研究所，福島県立医科大学医学部付属病院，宮城県赤十字血液センター，仙台社会保険病院，山形県立中央病院(以上 77 施設，郵便番号順)

5. まとめ

今回から QCWS は組織適合技術者認定制度委員会の担当となったため，昨年までとは QCWS の目

的や運営方法が大幅に変更された。特に，認定制度の主旨にそった試料の構成や選択を行ったこと，QCWS 集会の前に試料の DNA タイプを公表し，参加者自身が QCWS 集会までにタイピング結果を自身で検討できるようにしたことが主な変更点である。HLA タイピング技術を向上させる上では，いかなるサンプルをどのようにタイピングするかなど，種々異なる条件を考慮してタイピング方法を選択し，タイピング結果を評価することが必要であるため，今後も認定制度の主旨を生かした QCWS を行っていく。

第 7 回 HLA-QC ワークショップレポート —クラス I データ正解率検討—

中島文明¹⁾，太田正穂²⁾，柏瀬貢一³⁾，小林 賢⁴⁾，酒巻建夫⁵⁾，佐田正晴⁶⁾，
田中秀則³⁾，成瀬妙子⁷⁾，丸屋悦子⁸⁾，安波道郎^{9,10)}，木村彰方^{9,10)}
(日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会)

- 1) 神奈川県赤十字血液センター検査部，2) 信州大学医学部法医学，3) 東京都赤十字血液センター検査部，4) 防衛医科大学校検査部，5) 国立佐倉病院 HLA 検査室，6) 国立循環器病センター研究所，7) 東海大学医学部分子生命科学系，8) 特定非営利活動法人 HLA 研究所，9) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野，10) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部ゲノム多様性研究室

1. はじめに

今回からは認定制度委員会主催の QC ワークショップであり，これまでのように単に正解率の向上を求めるものではない。実際のタイピング現場を想定しつつ，さまざまな状況のサンプルにどのように対応すべきかを問われるプログラムとなっている。もちろん，タイピング結果は正解を求められるが，その結果を得るまでの過程が正しいか考えなければならない。時には結果が得られないことが正解の場合もありうる。ここで示す正解率はそのようなことを考える基礎データとしてとらえていただきたい。

2. 解析方法

今回は報告様式がエクセル・シートへの入力とな

り，各方法別入力他に総合判定を入力することになっており，ここでは総合判定のデータのみで解析した。総合判定は各方法で得られた結果を総括し，最終的にどのような結果へ導いたか，すなわち，検査結果をどのように報告するかということを想定して設けられた項目である。例えば，骨髄移植を行う医療機関の検査室において，移植患者や提供者の HLA タイピング結果を臨床移植チームにどのように報告するかといったことである。このような理由から最終判定結果のみを正解率算定の解析材料とした。

また，H1504/H1504R は解析から除外した。このサンプルは LOH，マイクロキメリズムあるいは contamination を想定して 2 種類の DNA 濃度を大幅に変えて混合してあるため，正解を求めるためではな

く、方法別でどのような結果が得られるかを検証するためにある。

細胞株 TAB を材料とした H1503/H1503R および H1506/H1506R は一部の施設で A*0207 に加え A*0201 も検出されたとの報告があり、現在確認中であることから、便宜上 A*0201 は不正解としてある。

さらに、70 施設以上の報告を集計すると各サンプル、各ローカスで 20 種類以上の異なった表記が認められ、何をもって正解とするか難しいところである。対立遺伝子名の増加、採用した方法や使用した市販キットの違い、判定シートや判定プログラムのアップデート時期の違いが多様な結果を生み出している。したがって、客観的な視点から外れるかもしれないが、あきらかに異なる結果のみを不正解とし、それ以外は正解とした。

以上のことをふまえ 3 種類の正解率を集計した。

- 1) サンプルおよびローカス別正解率(表 1)
- 2) 対立遺伝子型別正解率(表 2)

3) 検査方法別正解率(表 3)

それぞれについて、Low resolution および High resolution で集計した。

「サンプルおよびローカス別正解率」の「未記入」は総合判定で方法が記入され遺伝子型結果が未記入あるいは検出不能などと記入されていた数で、集計から除外した(表 1)。

「サンプルおよびローカス別正解率」および「検査方法別正解率」では両対立遺伝子型とも 4 桁表記以上の場合のみ High resolution の集計とした。

さらに、「サンプルおよびローカス別正解率」および「検査方法別正解率」では両対立遺伝子型とも正解した場合のみ正解とした(表 1, 3)。

3. 結果および考察

3.1. 正解率

全体として正解率 90% 台後半の数字を得ており、高水準の結果に達している。数年前までは Low

表 1 サンプルおよびローカス別正解率

	QC ID	HLA型	未記入	Low resolution				High resolution			
				報告数	正解数	正解率	Others	報告数	正解数	正解率	Others
A*	H1501 H1501 R	0217 2601		68	68	100.0%		59	58	98.3%	0201
	H1502 H1502 R	2501 3201		68	62	91.2%		56	49	87.5%	2605, A*2605 3203
	H1503 H1503 R	0207 2402	1	67	67	100.0%		54	50	92.6%	0201, 0201/09/12 0201/12/36
	H1505 H1505 R	2402	13	44	44	100.0%		39	37	94.9%	2404 2413/14
	H1506 H1506 R	0207 2402	8	53	52	98.1%	2	44	42	95.5%	A*0201 0201/09/12
				300	293	97.7%		252	236	93.7%	
B*	H1501 H1501 R	0801 1501		69	66	95.7%	B*01/08N *62, (Blank)	54	51	94.4%	08071554 1507/32/35/+
	H1502 H1502 R	4402 5101		69	69	100.0%		56	54	96.4%	*4403/13/26
	H1503 H1503 R	4601 5201		69	68	98.6%	1.Feb	60	60	100.0%	
	H1505 H1505 R	5201	15	44	44	100.0%		40	40	100.0%	
	H1506 H1506 R	4601 5201	4	57	55	96.5%	(Blank)	52	50	96.2%	5101/10 5107
				308	302	98.1%		262	255	97.3%	
Cw*	H1501 H1501 R	0303 0701		39	37	94.5%	*09 *07/02/03 /+	28	27	96.4%	0301/11
	H1502 H1502 R	0501 0102		39	38	97.4%	(Blank)	31	31	100.0%	
	H1503 H1503 R	0102 1202	1	38	37	97.4%	(Blank)	30	30	100.0%	
	H1505 H1505 R	1202	13	14	14	100.0%		12	12	100.0%	
	H1506 H1506 R	0102 1202	8	20	20	100.0%		17	17	100.0%	
				150	146	97.3%		118	117	99.2%	
				758	741	97.8%		632	608	96.2%	

表2 対立遺伝子型別正解率

	HLA型	Low resolution			High resolution			Others
		報告数	正解数	正解率	報告数	正解数	正解率	
A*	0207	120	119	99.2%	101	95	94.1%	2, *0201, A*0201, 0201/09/12, 0201/12/36
	0217	68	68	100.0%	59	58	98.3%	0201
	2402	165	165	100.0%	139	137	98.6%	2404, 2413, 2414
	2501	68	62	91.2%	58	52	90.0%	2605, A*2605
	2601	68	68	100.0%	59	59	100.0%	
	3201	68	68	100.0%	57	56	98.2%	3203
		557	550	98.7%	473	457	96.6%	
B*	0801	69	67	97.1%	54	53	98.1%	B*01/08N, 0807, (Blank)
	1501	69	68	98.6%	59	57	96.6%	*62, 1554, 1507/32/35/+
	4402	69	69	100.0%	56	54	96.4%	*4403/13/26
	4601	126	123	97.6%	116	116	100.0%	Feb-01, (Blank),
	5101	69	69	100.0%	57	57	100.0%	
	5201	170	168	98.8%	154	152	98.7%	5101/10, 5107, (Blank)
		572	564	98.6%	496	489	98.6%	
Cw*	0102	97	97	100.0%	80	80	100.0%	
	0303	39	38	97.4%	31	30	96.8%	*09, 0301/11
	0501	39	38	97.4%	32	32	100.0%	(Blank)
	0701	39	39	100.0%	29	29	100.0%	
	1202	72	71	98.6%	60	60	100.0%	(Blank)
			383	380	99.2%	312	311	99.7%
		1512	1494	98.8%	1281	1257	98.1%	

resolution > High resolution といった傾向が続いていたが、今回はそのようなことはなく、逆転しているケースさえみられる。近年、血清学的タイピングに代わり DNA タイピングが主流となり、合わせて市販タイピングキットが充実してきたことがその要因と考えられる。また、解像度においてクラス II > クラス I といった傾向にも差がなくなり、これも同様の理由と考えられる。

「サンプルおよびローカス別正解率」では、H1502/H1502R の A ローカスで A*2501 を A*2605 と判定した報告が数例あったことと、解析方法でも述べたとおり細胞株 TAB を材料としたサンプルで A*0201 の判定を不正解としてあり、これらが原因で A ローカス High resolution の正解率がやや低下している(表1)。

「対立遺伝子型別正解率」でも、同じく A*2501 → A*2605 と A*0207 → A*0201 の部分で正解率を落としている(表2)。

「検査方法別正解率」では検査方法数にしたがい正解率は高くなっているが、3法 High resolution のみ

低下している。これは究極の High resolution 検査法 SBT での不正解が原因である。最も多く採用されている SSO は市販キット別にみても内容はさまざま、ひと括りするには無理がある。これ1法で High resolution までもっていくには限界があり、場合によっては他方と組み合わせることが望ましい(表3)。

以上、不正解であった数%の内容は、本当の結果違いに加え、入力ミスや表記方法の乱れが目立った。本当の結果違いについては方法論別解析に譲ることとする。

3.2. 入力ミス

入力ミスはエクセル・シートへの入力が原因している。入力制限が全くない状態であったことから、日付のようなものが入力されていたり、間違いではないが、全角で入力されていたり、先頭に空白が付いていた、あるいはコピーして化けたり、切り取り・貼り付けのミスなど、ほとんどメモ書きと変わらない状態である。入力者は一度印刷して内容を確

表3 検査方法別正解率

	検査方法		Low resolution			High resolution		
			報告数	正解数	正解率	報告数	正解数	正解率
全て	SSP		282	274	97.2%	205	200	97.6%
	SSO		517	514	99.4%	466	446	95.7%
	RFLP		18	18	100.0%	18	18	100.0%
	SSCP		8	8	100.0%	8	8	100.0%
	RSCA		18	18	100.0%	18	18	100.0%
	SBT		77	77	100.0%	74	70	94.6%
	(u.k.)		22	21	95.5%	13	12	92.3%
			942	930	98.7%	802	772	96.3%
1法	SSP		155	148	95.5%	89	88	98.9%
	SSO		374	372	99.4%	334	320	95.8%
	RFLP		1	1	100.0%	1	1	100.0%
	SSCP		0	0	100.0%	0	0	100.0%
	RSCA		7	7	100.0%	7	7	100.0%
	SBT		28	28	100.0%	25	25	100.0%
			565	556	98.4%	456	441	96.7%
2法	SSP	SSO	87	86	98.9%	76	73	92.3%
		RFLP	7	7	100.0%	7	7	100.0%
		RSCA	3	3	100.0%	3	3	100.0%
		SBT	18	18	100.0%	18	17	94.4%
	SSO	SSO	10	10	100.0%	10	10	100.0%
		RFLP	3	3	100.0%	3	3	100.0%
		RSCA	4	4	100.0%	4	4	100.0%
		RSCA	11	11	100.0%	11	11	100.0%
			143	142	99.3%	132	128	97.0%
	3法	SSP	SSO+other	9	9	100.0%	9	9
SSO		SBT+other	14	14	100.0%	14	12	85.7%
		23	23	100.0%	23	21	91.3%	
4法	SSP+SSO+others		3	3	100.0%	3	3	100.0%
			3	3	100.0%	3	3	100.0%

認すべきである。また、今後はデータベースソフトを使用し、ある程度入力制限をかけた環境を提供することが望ましい。

3.3. 表記の乱れ

表記方法の乱れでは、A*2, B*62, Cw*09 など存在しない表記があり、これらは「血清対応型」と混同しているものと推測される。また、B*01/08N や Cw*07/02/03/+ という表記があり、それぞれ B*0801/08N, Cw*0701/02/03/+ と入力したかったのではないだろうか。B*4402/19, B*4402/19/23/+ は B*4402/19N, B*4402/19N/23/+ と表記すべきである。A*0201/04+, A*2402/07/09//+ や B*5201/03/- は手がすべったか。もはやカッコや「?」を付したものは論外である。

細胞株 AKIBA のみを材料とした H1505/H1505R は homozygote であることから、片方を空白とするか「-」を入力するケースがほとんどであるが、「-//+」と表記していた例があった。ブランク「-」は第6回QCワークショップ報告に提案されているように、区別出来ないアリの表記に用いるとされている。したがって、「//+」は第5回QCワークショップ報告に提案されているように、2桁レベルでも Ambiguity になることがある場合に使用する記号であり、ブランクを表す場合には用いない。同じく、B*5201//+, Cw*1202//+ といった表記もあり不適切である。

「アリル表記法と結果報告の原則について 2000」ではアリル名の5桁以上の表記は、5桁以上でアリルを特定できる場合にのみ用い、4桁/2桁表記を基

本とするため5桁表記が混在する表記はしないとしており、B*52011/012, B*44021/05/11/+, Cw*1202/032/08などは、それぞれB*5201, B*4402/05/11/+, Cw*12とすべきである。B*5201/12, B*52011/12は根本的に表記のルールから逸脱している。

さらに、これまで5桁目はアミノ酸同義置換の表記であったが、「Nomenclature for factors of the HLA system, 2002」に報告されているように、この部分は拡張され5桁目と6桁目で表記することと変更された。このことに対応した報告はごく僅かであった。

以上、表記が乱れていても総合判定の中に正解とされるアリル名が含まれていれば、正解として扱った。

3.4. まとめ

単なるA*2402, B*5201であるにもかかわらず数十種類の表記がされてしまうことに問題がある。実務において、このような結果を受け取る側はHLAの専門家でない場合が多く、非常に困惑することが予想できる。少なくとも、毎年提案されている表記のルールに従うことが我々の最低限の責務ではないだろうか。そして、このワークショップにおいては、参加されている方々の多くが検査結果を報告するために検査している訳であるから、その報告書と同等の意義を持つ総合判定はより注意深く作成すべきであると考えられる。

第7回 HLA-QC ワークショップレポート —HLA-ClassII タイピングの評価—

丸屋悦子¹⁾, 太田正穂²⁾, 柏瀬貢一³⁾, 小林 賢⁴⁾, 酒巻建夫⁵⁾, 佐田正晴⁶⁾,
田中秀則³⁾, 中島文明⁷⁾, 成瀬妙子⁸⁾, 安波道郎^{9,10)}, 木村彰方^{9,10)}
(日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会)

- 1) 特定非営利活動法人 HLA 研究所, 2) 信州大学医学部法医学, 3) 東京都赤十字血液センター検査部, 4) 防衛医科大学校検査部, 5) 国立佐倉病院 HLA 検査室, 6) 国立循環器病センター研究所, 7) 神奈川県赤十字血液センター検査部, 8) 東海大学医学部分子生命科学系, 9) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, 10) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部ゲノム多様性研究室

1. 配布 DNA

今回出題されたサンプルは以下の3項目を評価する目的で選択された。

- (1) 正確なタイピングができるか?
- (2) 奇妙なデータが得られるタイピング結果をどのように評価するか?
- (3) 微量サンプルのタイピングをどのように行なうか?

6種の homozygote cell line を配布 DNA のソースとした(細胞株の HLA 型を表1に示す)。配布された6種のサンプルはこれらの DNA を単独またはある比率で混合し作成された(表2に各サンプルの

DNA 混合比と予測される HLA 型を示す)。そのうち2種の DNA は濾紙に塗布(300ng/one piece)し各2枚ずつ配布された。

2. 参加施設

応募施設77のうちHLA-DRB1について72施設、HLA-DRB3/4/5について42施設、HLA-DQB1について37施設、HLA-DQA1について3施設、HLA-DPB1について5施設からデータの提出があった。

表 1 DNA ソースとなった homozygote cell line とその HLA 型

Cell ID	Name	A*	B*	C*	DRB1*	DQA1*	DQB1*	DPA1*	DPB1*
1	AMALA	0217	1501	0303	1402	0503	0301	01	0402
2	MGAR	2601	0801	0701	1501	0102	0602	01	0401
3	WT47	3201	4402	0501	1302	0102	0604	01	1601
4	BM92	2501	5101	0102	0404	03	0302	01	0402
5	TAB	0201,0207	4601	0102	0803	0103	0601	0202	0202
6	AKIBA	2402	5201	1202	1502	0103	0601	0202	0901

表 2 配布サンプルの HLA 型とソース DNA の混合比率

QC-ID	cell ID (ratio)	A	B	C	DRB1	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
H1501 1501R	1&2 (1:1)	0217, 2601	1501, 0801	0303, 0701	1402, 1501	0503, 0102	0301, 0602	01	0401, 0402
H1502 H1502R	3&4 (1:1)	3201, 2501	4402, 5101	0501, 0102	1302, 0404	0102, 03	0604, 0302	01	1601, 0402
H1503 H1503R	5&6 (1:1)	0201, 0207, 2402	4601, 5201	0102, 1202	0803, 1502	0103	0601	0202, 0201	0202, 0901
H1504 H1504R	5&6 (1:10)	(0201, 0207) 2402	(4601) 5201	(0102) 1202	(0803) 1502	0103	0601	(0202) 0201	(0202) 0901
H1505 H1505R	6	2402	5202	1202	1502	0103	0601	0201	0901
H1506 H1506R	5&6 (1:1)	0201, 0207, 2402	4601, 5201	0102, 1202	0803, 1502	0103	0601	0202, 0201	0202, 0901

3. HLA-Class II タイピングの評価方法

提出された HLA-class II タイピング結果の正誤判定は、表 2 に記載された HLA 型を正解とし、サンプル量別(濾紙 DNA と DNA 溶液)、タイピング resolution 別 (low or middle resolution と high resolution (4 桁)) に行なった。さらに Single method と Multi methods を使用した施設別に評価し、複数のタイピング法を使用する意味と選択した方法による正誤率への影響を比較した。

4. HLA-Class II 総合評価結果

表 3 から表 5 に HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DRB3/4/5 & DQA1 & DPB1 の抗原型と遺伝子型一致率を示す。

4-1. HLA-DRB1

1) 正確なタイピングができるか?

DNA 溶液で配布された 3 サンプル (H1501R, H1502R, H1503R) について、組織適合性検査者に要求される正確なタイピングとは、使用したキットの検出限界を把握し、得られた結果を判断し解答することである。表 3 から明らかなように、Single method を用いてタイピングした場合、抗原型は決定

できるが、ambiguity により遺伝子型の決定はできないと判定した施設が全体の 9 割を占めていた。すなわち 9 割の施設の tissue typer が正確にタイピングをしていることを示している。SBT や RSCA を使用した場合、Single method だけでも遺伝子型の決定が可能な場合がある。しかし今回の QC では、multi methods を使用した施設のなかに SBT を行なっている施設が複数あり、それらすべての施設が正しい遺伝子型を解答したわけではなかった。このことから、SBT 法に技術的に困難な点がまだ残されていることが推測される。

複数の方法を用いタイピングする場合、ひとつの方法により得られた結果を他方で確認する目的と、異なった原理のタイピング法を組み合わせることにより、ambiguity を解消しより詳しい結果を得る目的とがある。今回の結果から抗原型のタイピングにはどの原理のタイピング法を用いても、単一法で十分正しい結果が得られることが判った。遺伝子型タイピングには異なる原理のタイピング法をうまく組み合わせることで 4 桁レベルのタイピングが可能になることが判った。組織適合性検査者は要求されるタイピングの精度により、最適なキットを選択する能力、および技術の習熟が要求される。

表 3 HLA-DRB1 抗原型 & 遺伝子型一致率

参加施設数 : 72

Single Method	SSP	SSOP	RFLP	DR	SBT	RSCA	Pel	Comment	
	Dynal, One Lambda, Pel	RELI, MPH, INNO-LiPA, LABType, Luminex	Lab, 自家製	ABI, Visi	Forensic, ABI, Visi	RSCA			
施設数	15	25	3	3	2	2	1		
Group 1(3) DNA 溶液 H1501R: 1402/1501, H1502R: 0404/1302, H1503R: 0803/1502	Low (middle) 正解数	15	25	3	2	2	1	** : Dynal All set (33本のプライマー使用) での結果 Luminex使用で日本人としてタイプした場合は結果が1例, 同一ロットのRELIを使用した6施設中の1施設の結果	
	4桁レベル正解数	1 [#]	2 ^{###}	3	2	2	1	*** : 同一ロットのRELIを使用した6施設のうち3施設の結果 記法に問題あり, H1505Rの判定を1502/1502 \$: 表	
Group 2 (2) 濾紙DNA H1505R: 1502/- H1506R: 0803/1502	Low (middle) 正解数	6 ^{###}	25	3	2	2	1	# : Ambiguity , ##: Ambiguity and error ###: not tested	
	4桁レベル正解数	1 ^{#s}	3 ^{###}	3 ^s	2	2	1		
施設数	10	2	2	2	2	2	1	1	
Multi Method	SSP + SSOP	SSOP + SSCP	SSP + RFLP	SSP + SBT	SSOP + SBT	SSOP + LP	SSOP + RFLP	SSOP + RFLP	SSP + SSOP + SSCP + SBT
	10	2	2	2	2	2	1	1	2
Group 1(3) DNA 溶液 H1501R: 1402/1501, H1502R: 0404/1302, H1503R: 0803/1502	Low (middle) 正解数	10	2	2	2	2	1	1	2
	4桁レベル正解数	4 ^{##}	1 [#]	1 [#]	0 [#]	0 [#]	0 [#]	1	0 [#]
Group 2 (2) 濾紙DNA H1505R:1502/- H1506R: 0803/1502	Low (middle) 正解数	8 ^{##}	2	2	2	2	1	1	2
	4桁レベル正解数	3 ^{##}	2	1 [#]	1 [#]	1 [#]	0 [#]	1	0 [#]

表 4 HLA-DQB1 抗原型 & 遺伝子型一致率

参加施設数 : 37

Single Method		SSP Dynal, One Lambda,	SSOP MPH	RFLP DR Lab, 自 家製	SBT Forensic		
施設数		16	3	4	1		
Group 1 (3) DNA 溶液 H1501R: 0301/0602, H1502R: 0604/0302, H1503R: 0601/-	Low (middle) 正解数	14*	3	4	1		
	4桁レベル正解 数	1 ^{\$}	0 [#]	1 [#]	1		
Group 2 (2) 濾紙DNA H1505R: 06011/- H1506R: 0601/-	Low (middle) 正解数	4 ^{###}	3	4	1		
	4桁レベル正解 数	0 [#]	3	4 ^{\$}	1		
Multi Method		SSP + SSOP Dynal One Lambda, RELI, LABType	SSOP + SSCP MPH, 自家製	SSP + RFLP 自家製	SSOP+RF LP MPH, 自家製	SSCP + RFLP 自家製	SSOP+ SSCP+ RFLP RELI 自家製
施設数		4	3	3	1	1	1
Group 1 (3) DNA 溶液 H1501R: 0301/0602, H1502R: 0604/0302, H1503R: 0601/-	Low (middle) 正解数	4	3	3	1	1	1
	4桁レベル正解 数	0 [#]	3	3	1	0 [#]	1
Group 2 (2) 濾紙DNA H1505R: 06011/- H1506R: 0601/-	Low (middle) 正解数	4	3	3	1	1	1
	4桁レベル正解 数	4	3	3	1	1	1

* : 同一キット使用の2施設でエクストラallele (0303/06/12) がH1503,H1504に検出された。

\$: 表記法に問題あり H1503R, H1505R, H1506Rを0601/0601

: Ambiguity

: not tested

表 5 HLA-DRB3/4/5 & DQA1 & DPB1 抗原型と遺伝子型一致率

参加施設数 : 42

HLA-DRB3/4/5 Single Method		SSP Dynal, One Lambda, Pel	SSOP RELI LABType	RFLP 自家製
施設数				
Group 1 (3) DNA 溶液 H1501R: B3*0101, B5*0101, H1502R: B3*0301, B4*01, H1503R: B5*0102,-	Low (middle) 正解数	19	17	1
	4桁 レベル正 解数	15 ^{###}	15 [*]	1
Group 2 (2) 濾紙DNA H1505R: B5*0102,- H1506R: B5*0102,-	Low (middle) 正解数	7 ^{###}	17	not tested
	4桁 レベル正 解数	0 [*]	3 [#]	not tested
施設数				
HLA-DRB3/4/5 Multi Method				
Group 1 (3) DNA 溶液 H1501R: B3*0101, B5*0101, H1502R: B3*0301, B4*01, H1503R: B5*0102,-	Low (middle) 正解数	1	3	1
	4桁 レベル正 解数	0 [*]	0 [#]	1
Group 2 (2) 濾紙DNA H1505R: B5*0102,- H1506R: B5*0102,-	Low (middle) 正解数	1	3	1
	4桁 レベル正 解数	1	0 [#]	1

参加施設数 : 5

HLA-DPB1 Method		RFLP 自家製	SBT Foren s ic	SSOP+ SSCP INNO-LIPA 自家製	RFLP+S SCP+S BT
施設数					
Group 1 (3) DNA 溶液 H1501R: 0401/0402, H1502R: 1601/0402, H1503R: 0202/0901	Low (middle) 正解数	2	1	1	1
	4桁 レベル正 解数	2	0 [*]	1	1
Group 2 (2) 濾紙DNA H1505R: 0901/- H1506R: 0202/0901	Low (middle) 正解数	2	1	not tested	not tested
	4桁 レベル正 解数	2	1	not tested	not tested
施設数					
HLA-DQA1 Method					
Group 1 (3) DNA 溶液 H1501R: 0503/0102 H1502R: 0102/003, H1503R: 0103/-	Low (middle) 正解数	3			
	4桁 レベル正 解数	0 [*]			
Group 2 (2) 濾紙DNA H1505R: 0103/- H1506R: 0103/-	Low (middle) 正解数	3	# : Ambiguity	### : not tested	& : error
	4桁 レベル正 解数	3 ^{\$}	\$: H1505R, H1506R		の判定を0103/0103としていた

2) 奇妙なデータが得られるタイピング結果をどのように評価するか？

配布されたサンプル H1504 (H1504R) は 2 種類の homozygote DNA を 1:10 の割合で混合し作成された。タイピングに使用するキットの検出限界の違いすなわち 1/10 の DNA が増幅されるか否かにより、奇妙なデータが得られる場合と得られない場合がある。奇妙なデータとは片方のハプロタイプ由来の signals がもう一方のハプロタイプ由来の signals より弱い現象である。サンプル中に含まれる遺伝子量に違いが生じる現象は白血球細胞が LOH (loss of heterogeneity) を起こしている白血病患者さんの血液サンプルに見られる。臨床検体とくに白血病患者の検体を扱う組織適合性検査者はキットの検出限界を周知し、検査検体の種類によりタイピングに使用するキットの選択に注意を要する場合がある。

3) DNA サンプルが微量の場合のタイピングをどのように行なうか？

濾紙に塗布された DNA サンプル、H1505R と H1506R は検査に用いることができる DNA が微量の場合、組織適合性検査者はどのようなタイピング技術を用いてタイピングするかを問うため出題された。結果は出題者の予想に反し、使用できるサンプル量に関わらず、各施設で実施している方法でタイピングができるかどうかを問う結果となってしまった。表 3 の結果から明らかなように、SSP 法はサンプル DNA 量が少ない場合には適していない方法である。しかし驚くことにこの方法でタイプできた施設が複数あった。さらに驚異的なことに、3 施設で 4 種もの方法(そのうち 3 種類の方法はキットを使用)を用いたタイピング結果が出されたことである。しかしながら組織適合性検査者は使用できるサン

ル量に応じ、無理のない検査方法を選択すべきである。

4-2. その他の HLA-class II タイピング

提出されたデータ数が HLA-DRB1 に比べ小数のため、抗原型・遺伝子型での一致率を表に示すことにとどめる。

5. まとめ

今回の HLA-class II QC ワークショップの結果から得られた問題点を以下にまとめる。

1. DNA sample を用いたタイピングであっても、検出できるアレルが一種である場合、そのアレルの homozygote としてタイプすべきでない。家系調査により haplotype として確認された場合のみ homozygote として記載できる。
2. 人種の情報が未知のサンプルをタイピングする場合、日本人用の判定ソフトを使用し判定するのは危険である。
3. 複数のキットを用いる意義: Resolution の向上を計るためにキットを組み合わせる場合はキットごとの ambiguity をよく確認し、追加キットの選択を行なうことが必要である。
4. SBT 法や RFLP 法は施設間差がみられた。キット差・解析ソフト差・検査と解析の習熟度差などの要因が考えられる。
5. 最大の問題点は永久に存続する ambiguity について今後どのように対応するかである。臨床への報告形式の統一を目標に、以前(血清学での検査)の報告形式をも考慮に入れ、混乱を回避すべく、表記法について検討することが求められる。

第7回 HLA-QC ワークショップレポート —方法論別生データ検討 (PCR-SSO)—

酒巻建夫¹⁾, 野田 岳¹⁾, 飯田好江¹⁾, 山崎正明¹⁾, 太田正穂²⁾, 柏瀬貢一³⁾, 小林 賢⁴⁾, 佐田正晴⁵⁾,
田中秀則³⁾, 中島文明⁶⁾, 成瀬妙子⁷⁾, 丸屋悦子⁸⁾, 安波道郎^{9,10)}, 木村彰方^{9,10)}
(日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会)

1) 国立佐倉病院 HLA 検査室, 2) 信州大学医学部法医学, 3) 東京都赤十字血液センター検査部, 4) 防衛医科大学
校検査部, 5) 国立循環器病センター研究所, 6) 神奈川県赤十字血液センター検査部, 7) 東海大学医学部分子
生命科学系, 8) 特定非営利活動法人 HLA 研究所, 9) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野,
10) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部ゲノム多様性研究室

1. 検体の特徴と狙い

今回は6種類の細胞株を単独 (H1505) あるいは1:1 (H1501, 1502, 1503, 1506) や1:10 (H1504) で混合されたものが配布された。目的1として正確なタイピングあるいは正確な記載, 2としてLOHまたはコンタミネーションを想定した場合 (H1504) の対応, 3として紙添付した微量検体 (H1505, 1506) からのタイピングがあった。PCR-SSO法ではPCR開始時のテンプレートDNA量にほぼ比例してPCR増幅が行われるので, 少量混合されている遺伝子のタイピング (H1504中に存在)がどのような影響を受けるかが大きな焦点であった。

2. 原理

PCR-SSO法はHLAクラス毎にgeneric primersを用いてPCR増幅し, PCR産物に対して配列特異的なプローブとの反応を検出することにより特異性を決定するものである。通常は多数のプローブがストリップ, ウェル, ビーズなどに固定され, ビオチンなどの標識プライマーで増幅されたPCR産物を一本鎖に変性して反応させ, その後はEIA等の原理で色素沈着や蛍光発色させる方法を採用するリバースタインタイプが多いが, なかにはPCR産物側を固定し, 標識プローブとの反応を検出通常タイプがある。

3. 方法の特徴および調整

PCR-SSO法の場合にはPCR-SSP法に比べてサ

ンプルDNA量が極端に少ない場合にも検査できるという特徴がある。同じ長さのプローブでは多型性部位の配列がGCリッチの場合には結合力が強くATリッチな場合には弱い傾向がある。このために多くの市販製品では洗浄温度を厳密に指定すると共にプローブの長さを調整したり固定化プローブの量を調整したりしている。このようにして一定の水準以上の発色強度を保ったり強すぎる反応を抑えたりする工夫をしている。さらにこれでも非特異性が影響する場合には, 個々のプローブの発色強度閾値(基準)を高めを設定する方法を採用している。この調整はPCR増幅後の予想されるコピー数の範囲を想定して検討されている。メーカー側ではプローブの大まかな部位は公表しているが, 長さや結合させている量については一般的には公表していないのが現状である。

4. PCR-SSOキットの使用状況

今回の精度管理におけるPCR-SSO法の使用状況は参加72施設においてほぼ55%となっている。SSOキットの内訳ではA, B, DRB1遺伝子に対して重複使用を含めてダイナル・リライが55-56%, 湧永・MPHが30-34%, シオノギ・MRHAが4%, ワンラムダ・LABTypeが4%, ゲノムサイエンス・Luminexが4%, イノジェネティックス・INNO-LiPAが2%程度の使用となっていた(図1, H1501とH15093について表示)。これらの使用状況は遺伝子座や検体によっても異なっていた。

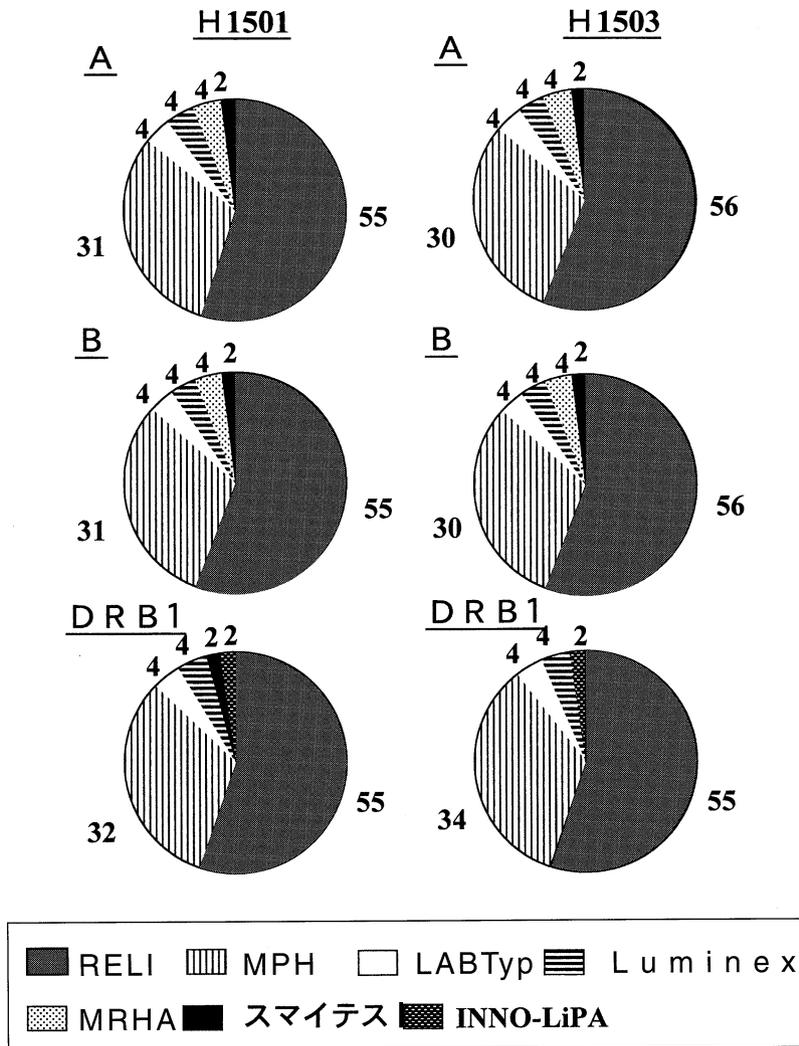


図1 SSO 市販キットの使用率 (%)

表1 サンプル別のSSO 使用率 (%)

HLA-	H1501	H1502	H1503	H1504	H1505	H1506
A	57	47	62	54	84	85
B	58	54	62	60	85	87
DRB1	64	51	62	53	75	67

参加施設 72

ろ紙添付の少量サンプル検体では SSO 法の採用が増加していた(表 1)。クラス I では 84-87%、DRB1 では 67, 75% となっていた。

今回のまとめでは比較検討のためにジェネリック増幅をかけプローブと反応させるタイピングに焦点

を絞る, 参加施設数が多いリライおよび MPH を対象に解析を進めた。

5. タイピング結果の一致状況

SSO 法によるタイピング結果と細胞株のコンセン

表 2-1 H1501 コンセンサスとの一致率 (SSO 法)

	A			B			C			DRB1			DQB1		
	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)
REL I (施設別)	27	27	100	29	29	100	7	5	71	26	24	92	6	6	100
(アレル数)	54	54	100	58	58	100	14	12	86	52	50	96	12	12	100
MPH (施設別)	16	16	100	16	16	100	10	10	100	15	15	100	7	7	100
(アレル数)	32	32	100	32	32	100	20	20	100	30	30	100	14	14	100
MRHA (施設別)	2	2	100	2	2	100	2	2	100						
(アレル数)	4	4	100	4	4	100	4	4	100						
LABType (施設別)	2	2	100	2	2	100	1	1	100	2	2	100			
(アレル数)	4	4	100	4	4	100	2	2	100	4	4	100			
Luminex (施設別)	2	2	100	2	2	100				2	2	100			
(アレル数)	4	4	100	4	4	100				4	4	100			
スライズ (施設別)	1	1	100	1	0	0				2	2	100			
(アレル数)	2	2	100	2	1	50				4	4	100			
INNO-LiP (施設別)										1	1	100			
(アレル数)										2	2	100			
(施設別)	50	50	100	52	51	98	20	20	100	48	46	96	13	13	100
(アレル数)	100	100	100	104	103	99	40	40	100	96	94	98	26	26	100

表 2-2 H1502 コンセンサスとの一致率 (SSO 法)

	A			B			C			DRB1			DQB1		
	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)
REL I (施設別)	27	21	78	29	29	100	6	6	100	25	23	92	6	6	100
(アレル数)	54	48	89	58	58	100	12	12	100	50	48	96	12	12	100
MPH (施設別)	15	14	93	16	14	88	10	10	100	16	15	94	7	7	100
(アレル数)	30	29	97	32	30	94	20	20	100	32	31	97	14	14	100
MRHA (施設別)	2	2	100	2	2	100	2	2	100						
(アレル数)	4	4	100	4	4	100	4	4	100						
LABType (施設別)	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	1	50			
(アレル数)	4	4	100	4	4	100	4	4	100	4	3	75			
Luminex (施設別)	2	2	100	2	2	100				2	2	100			
(アレル数)	4	4	100	4	4	100				4	4	100			
スライズ (施設別)	1	1	100	1	1	100				1	1	100			
(アレル数)	2	2	100	2	2	100				2	2	100			
INNO-LiP (施設別)															
(アレル数)															
(施設別)	49	42	86	52	50	96	20	20	100	46	42	91	13	13	100
(アレル数)	98	91	93	104	102	98	40	40	100	92	85	92	26	26	100

表 2-3 H1503 コンセンサスとの一致率 (SSO 法)

	A			B			C			DRB1			DQB1		
	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)
REL I (施設別)	28	28	100	29	29	100	6	6	100	26	26	100	5	5	100
(アレル数)	56	56	100	58	58	100	12	12	100	52	52	100	5	5	100
MPH (施設別)	15	14	93	16	16	100	10	10	100	16	16	100	7	7	100
(アレル数)	30	29	97	32	32	100	20	20	100	32	32	100	7	7	100
MRHA (施設別)	2	2	100	2	2	100	2	2	100						
(アレル数)	4	4	100	4	4	100	4	4	100						
LABType (施設別)	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100			
(アレル数)	4	4	100	4	4	100	4	4	100	4	4	100			
Luminex (施設別)	2	2	100	2	2	100				2	2	100			
(アレル数)	4	4	100	4	4	100				4	4	100			
スライズ (施設別)	1	1	100	1	1	100				1	1	100			
(アレル数)	2	2	100	2	2	100				2	2	100			
INNO-LiP (施設別)															
(アレル数)															
(施設別)	50	49	98	52	52	100	20	20	100	47	47	100	12	12	100
(アレル数)	100	99	99	104	104	100	40	40	100	94	94	100	12	12	100

表 2-4 H1504 コンセンサスとの一致率 (SSO 法)

	A			B			C			DRB1			DQB1		
	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)
REL I (施設別)	28	25	89	29	20	69	5	4	80	26	19	73	4	4	100
(アレル数)	56	52	93	58	48	83	10	9	90	52	45	87	5	5	100
MPH (施設別)	15	12	80	16	11	69	10	6	60	15	14	93	7	7	100
(アレル数)	30	27	90	32	27	84	20	16	80	30	29	97	7	7	100
MRHA (施設別)	2	2	100	2	2	100	2	2	100						
(アレル数)	4	4	100	4	4	100	4	4	100						
LABType (施設別)	2	0	0	2	0	0	2	1	50	2	2	100	1	1	100
(アレル数)	4	1	25	4	1	25	4	3	75	4	4	100	1	1	100
Luminex (施設別)	2	1	50	2	2	100				2	2	100			
(アレル数)	4	2	50	4	4	100				4	4	100			
スライズ (施設別)	1	1	100	1	1	100				1	1	100			
(アレル数)	2	2	100	2	2	100				2	2	100			
INNO-LiP (施設別)										1	1	100			
(アレル数)										2	2	100			
(施設別)	50	41	82	52	36	69	19	13	68	47	39	83	12	12	100
(アレル数)	100	88	88	104	86	83	38	32	84	94	86	92	13	13	100

表 2-5 H1505 コンセンサスとの一致率 (SSO 法)

	A			B			C			DRB1			DQB1		
	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)
RELI (施設別)	30	28	93	31	31	100	5	5	100	28	26	93	5	5	100
(アリル数)	30	27	90	31	31	100	5	5	100	28	26	93	5	5	100
MPH (施設別)	13	12	92	13	13	100	6	6	100	15	15	100	4	4	100
(アリル数)	13	11	85	13	13	100	6	6	100	15	15	100	4	4	100
MRA (施設別)	2	1	50	2	1	50	1	1	100						
(アリル数)	2	1	50	2	1	50	1	1	100						
LABType (施設別)	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100	1	1	100
(アリル数)	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100	1	1	100
Luminex (施設別)	2	2	100	2	1	50				1	1	100			
(アリル数)	2	2	100	2	1	50				1	1	100			
マリスト (施設別)	1	1	100	2	2	100									
(アリル数)	1	1	100	2	2	100									
INNO-LIP (施設別)															
(アリル数)															
(施設別)	50	46	92	52	50	96	14	14	100	46	44	96	10	10	100
(アリル数)	50	44	88	52	50	96	14	14	100	46	44	96	10	10	100

表 2-6 H1506 コンセンサスとの一致率 (SSO 法)

	A			B			C			DRB1			DQB1		
	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)	報告数	一致数	一致率 (%)
RELI (施設別)	30	30	100	31	29	94	5	5	100	28	28	100	5	5	100
(アリル数)	60	60	100	62	60	97	10	10	100	56	56	100	5	5	100
MPH (施設別)	12	10	83	13	12	92	5	5	100	16	13	81	4	4	100
(アリル数)	24	21	88	26	25	96	10	10	100	32	29	91	4	4	100
MRA (施設別)	2	1	50	2	1	50	1	1	100						
(アリル数)	4	2	50	4	2	50	2	2	100						
LABType (施設別)	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100			
(アリル数)	4	4	100	4	4	100	4	4	100	4	4	100			
Luminex (施設別)	2	2	100	2	2	100				2	2	100			
(アリル数)	4	4	100	4	4	100				4	4	100			
マリスト (施設別)				2	1	50									
(アリル数)				4	3	75									
INNO-LIP (施設別)															
(アリル数)															
(施設別)	48	45	94	52	47	90	13	13	100	48	45	94	9	9	100
(アリル数)	96	91	95	104	98	94	26	26	100	96	93	97	9	9	100

サスタイプと比較すると、H1504 検体を除ききわめて良好な結果となっていた(表 2-1~表 2-6)。プレート DNA 量が少ないと考えられる H1505, 1506 の検体では若干正解率が低下しているが、これらは PCR 増幅そのものが十分に行われなかった可能性がある。正解が得られなかったところは判定に問題があるのか反応条件とりわけ PCR 増幅や洗浄温度などを調べてみる必要あると考えられる。

施設によってはさらに抗原グループ特異的な PCR 増幅を実施して高精度化に取り組んでいるが解析は省略した。

6. LOH を模した検体に対する結果

H1504 の検体には H1503 の検体に比べてセルライン TAB 由来の DNA が 10 分の 1 量しか含まれていない。それにも拘わらず少量混合検体側のタイピングが正確に行われた施設が存在した。この違いについての解釈は少なくとも 2 通りあると考えられる。一つはこれらの施設では PCR 産物が十分に得られ

ていること。当該施設に対して PCR 後の増幅産物濃度の調査を実施していないので確定はできないが、プレート量、PCR 機器の微妙な温度差、使用プログラムなどが関係している可能性がある。2 つ目は陽性と判定している施設では個々のプローブ反応性の強弱の特性を熟知して多少弱い反応のものでも陽性と判定していることが考えられる。

7. LOH 模し検体における個別プローブの反応性

LOH を模した検体のうち低濃度検体に陽性に反応するプローブを(表 3-1, 3-2) に示した。この表では他方の特異性に共通して反応するプローブの部分は削除してある。H1503 と H1504 を並べて比較すると MPH でもリライでも陽性率の低下がプローブにより異なっている。クラス I タイピングに対し総じて MPH では陽性率が半減するが、リライでは 8 割程度にとどまっている。またリライでは B 座プローブ #20 が全く影響を受けないのに対し、プローブ #22 では H1503 の検体では 11% の低下が観察され

表 3-1 低濃度検体のプローブへの影響(混合検体の陽性 %)

MPH								
A Locus	probe No	#1	#4	#8	#11	#20	#24	
	* : 0207	*	*	*	*	*	*	
H1503		100	80	87	100	100	100	
H1504		53	20	13	73	60	47	
B Locus	probe No	#6	#7	#14	#17			
	* : 4601	*	*	*	*			
H1503		100	69	94	100			
H1504		44	19	56	56			
DRB1	probe No	#5	#15	#21	#24	(#7)	(#9)	(#13)
	* : 0803	*	*	*	*	*	*	*
H1503		85	85	92	85	100	100	0
H1504		92	83	83	67	100	100	0

括弧は旧キット

表 3-2 低濃度検体のプローブへの影響(混合検体の陽性 %)

RELI								
A Locus	probe No	#2	#5	#12	#20	#27		
	* : 0207	*	*	*	*	*		
H1503		100	100	100	100	100		
H1504		75	89	89	82	75		
B Locus	probe No	#9	#20	#22	#26	#29	#41	#49
	* : 4601	*	*	*	*	*	*	*
H1503		100	100	89	100	100	100	100
H1504		70	100	19	78	96	85	74
DRB1	probe No	#6	#23	#27	#33			
	* : 0803	*	*	*	*			
H1503		100	100	100	92			
H1504		81	73	54	19			

H1504 検体になると 81% も低下している。MPH でも同様な例が認められた。さらにこのような低下は DRB1 に対してもほぼ同様に認められている。クラス I では MPH のほうがやや大きく影響されるがこのことはカットオフ値がやや高めであることと関連があるのかも知れない。MPH・DRB1 の旧タイプのキットなどでは影響が出にくいこと、その場合の設定カットオフ値が低いことなどから推測された。

8. まとめ

多くの HLA 検査施設が PCR-SSO 法で精度管理検体検査を実施した。成績も満足行くものと考えられた。少量サンプルのタイピングにも対応できる方法である。

LOH を模した検体では混合量が少ない特異性に対するプローブの反応が一律に低下するのではなく、

影響を受けやすいプローブと受けにくいプローブが存在することが明らかとなった。今回の組み合わせでは一部のプローブについて検証されたが、全てのプローブの反応性の強弱について理解しておく通常タイピングでも誤りが少なくなると考えられる。通常検査で 3 つ以上の特異性が検出されれば検体のコンタミネーションが容易に疑われるが、プローブ反応に過剰の強弱が認められ、アサインできないような場合にはコンタミネーションを疑うきっかけとなると思われた。

LOH を模した検体の場合に PCR-SSO 法が、PCR-SSP 法の特徴と、たとえばエンドポイント判定とレイトアッセイ法(リアルタイム PCR 法)との違いを含めて、どのように異なるかを理解しておくことが大切である。

第7回 HLA-QC ワークショップレポート —方法論別生データ検討 (PCR-SSP)—

小林 賢¹⁾, 太田正穂²⁾, 柏瀬貢一³⁾, 酒巻建夫⁴⁾, 佐田正晴⁵⁾, 田中秀則³⁾,
中島文明⁶⁾, 成瀬妙子⁷⁾, 丸屋悦子⁸⁾, 安波道郎^{9,10)}, 木村彰方^{9,10)}
(日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会)

1) 防衛医科大学校検査部, 2) 信州大学医学部法医学, 3) 東京都赤十字血液センター検査部, 4) 国立佐倉病院 HLA 検査室, 5) 国立循環器病センター研究所, 6) 神奈川県赤十字血液センター検査部, 7) 東海大学医学部分子生命科学系, 8) 特定非営利活動法人 HLA 研究所, 9) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, 10) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部ゲノム多様性研究室

1. サンプル #H1501/R

1-1. HLA クラス I タイピング(表 1)

市販キットのメーカー, ロットによらず, 全体的に良好な反応結果であった。しかし, 一部のプライマーセットで偽陽性と偽陰性反応がみかけられた。

OneLambda 社製の MicroSSP Generic HLA Class I DNA Typing Kit (MicroSSP 1L) のウエルポジション 5H (B*08 (B*0806 と B*0813 を除く), B*41 と B*42) のプライマーセットが 6 施設中 1 施設で偽陰性であった(表 1c)。この施設では, B 遺伝子座の

表 1 サンプル H1501/R の各市販キット別の反応とアサインメント結果(クラス I アリル)

Kit: OneLambda MicroSSP JPN		1	1	3	3	4	5	5	5	7	7	8	8	8	9	Local Assignment						
DNA Sample: H1501/R		G	C	B	B	A	H	H	D	C	H	B	G	F	A	F	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Laboratory	Lot #	2	6	7	23	24	25	33	37	38	49	55	58	59	64	67	0201/02/+	2601/02/+	0801/04/+	1501/04/+	0303	0701/02/+
008	University	002	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/+	2601/02/+	0801/04/+	1501/04/+	0303	0701/02/+
015	Hospital	002	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2601/02/03/+	0801/04/05/+	1501/04/07/+	0303	0701/02/03/+
018	Typing Lab	002	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2601/02/03/+	0801/04/05/+	1501/02/04/+	0303/11/12	0701/04/05/+
003	Hospital	003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6	0201/02/03/+	2601/02/03/+	0801/04/05/+	1501/04/07/+	0303/11/12/+	0701/02/03/+
013	Blood Center	003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*02	*26	*0801/04/05/+	*1501/04/07/+	*0303/11/+	*07
031	Hospital	003	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6						
052	Blood Center	003	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6						
064	Blood Center	003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6	0201/02/03/+	*2601/02/03/+	*0801/04/05/+	*1501/04/07/+	*0303/11/12/+	*0701/02/03/+
067	Blood Center	003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6	0201/02/03/+	2601/02/03/+	0801/04/05/+	1501/04/07/+	0303/11/12/+	0701/02/03/+
Ave.			7.2	7.6	7.8	7.3	7.1	7.3	7.6	7.6	7.8	7.8	7.3	7.1	6.9	6.9						

Kit: OneLambda MicroSSP AB/DR		1	2	2	4	5	5	6	6	6	7	9	9	10	Local Assignment				
DNA Sample: H1501/R		E	G	F	A	B	A	H	F	A	B	G	F	H	HLA-A		HLA-B		
Laboratory	Lot #	4	10	11	32	39	40	41	43	48	55	66	67	73	A*02	A*26	B*08	B*15	
016	Hospital	04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	A*02	A*26	B*08	B*15	
021	Hospital	04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*02	*26	*08	*15	
038	Institute	04A	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0201/02/03/+	2601/02/03/+	0801/04/05/+	1501/07/26/+	
047	Typing Lab	04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2601/02/03/+	0801/04/05/+	1501/07/26/+	
059	Hospital	04A	6	8	8	6	8	8	8	8	6	8	8	8	0201/02/03/+	2601/02/03/+	0801/04/05/+	1501/07/26/+	
Ave.			7.2	8.0	7.6	7.2	7.6	8.0	7.8	8.0	7.6	8.0	8.0	7.6	7.6				

Kit: OneLambda MicroSSP 1L		1	1	2	2	5	6	6	6	6	7	8	9	9	10	11	12	Local Assignment						
DNA Sample: H1501/R		E	D	F	E	H	H	G	F	D	F	F	B	A	C	F	E	G	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Laboratory	Lot #	4	5	11	12	33	41	42	43	45	51	59	71	72	78	83	84	90	0201/02/03/+	2601/02/04/+	0807	1501/07/26/+	0303/11/12/+	0701/02/03/+
043	Hospital	04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*02	*26	*08	*15	*0303	*07
045	Blood Center	04A	6	8	8	6	8	8	6	6	6	8	8	6	6	8	8	8	#	\$	B*0801/04-05/08N/10		Cw*0303-11-13	f
058	Blood Center	004	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*0201/02/03/+	*2601/02/04/+	*1501/07/26/+	*0801/05/08N/+		
064	Blood Center	004	8	8	8	8	nt	→											*0801/+	*1501/+	*0701	*0303		
068	Blood Center	04A	6	6	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*02	*26	*0801/+	*1501/+	*0701	*0303
076	Hospital	04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2601/02/04/+	-	1501/07/26/+	0303/11/12/+	0701/02/03/+
050	Hospital	004	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	nt	→	0201/02/03/+	2601/02/04/+	0801/04/05/+	1501/07/26/+		
Ave.			7.4	7.7	8.0	7.7	6.8	7.7	8.0	7.7	7.7	7.7	8.0	8.0	7.3	7.7	8.0	8.0	# A*0201-07/09-18/21-38/40-49/51	\$ A*2601-02/04/08/10-15/17	B*0801/04-05/08N/10	: B*1501/01-01/14/07/28N-28/32-35/38/45/50/56/60/63	f: Cw*07011-03/05-10/13-15	

Kit: Pel-Freez ABC SSP UniTray		1	2	4	4	4	5	5	7	9	10	10	11	12	Local Assignment						
DNA Sample: H1501/R		B	A	B	D	E	G	B	C	H	B	D	F	B	C	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Laboratory	Lot #	2	9	28	28	29	31	34	35	56	66	76	78	82	90	0201/02/04/+	2601/02/04/+	0801/05/07/+	1501/04/07/+	0303/11/12	0701/04/05/+
004	Blood Center	027.028	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/04/+	2601/02/04/+	0801/05/07/+	1501/04/07/+	0303/11/12	0701/04/05/+
006	Maker	028	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0201/02/+	2601/02/+	0801/05/+	1501/04/+	0303/11/12	0701/04/+
014	Hospital	027	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*0217	*2601	*0801/05/07/+	*1501/04/07/+	*0303	*0701
023	Hospital	028	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*02	*26	*08	*15	*03	*07
Ave.			7.5	7.0	7.5	7.5	6.5	7.0	7.5	7.0	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5						

表2 各タイプングキットにおいて推奨されるアサインメント例(アリル表記)

Sample	Kit	Good Assignment									
		HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1		HLA-DQB1	
H1501R	OneLambda MicroSSP Japanese HLA class I and II ABCDRDQ DNA Typing Kit	A*02 A*0201/02/+	A*26 A*2601/02/+	B*08 B*0801/04/+	B*15 B*1501/04/+	Cw*03 Cw*0303/11/+	Cw*07 Cw*0701/02/+	DRB1*14 DRB1*1401/02/+	DRB1*15 DRB1*1501/02/+	DQB1*03 DQB1*0301/04/+	DQB1*06 DQB1*0601/02/+
	OneLambda MicroSSP HLA class I and II ABDR DNA Typing Kit	A*02 A*0201/02/+	A*26 A*2601/02/+	B*08 B*0801/04/+	B*15 B*1501/07/+			DRB1*14 DRB1*1402/03/+	DRB1*15 DRB1*1501/02/+		
	OneLambda MicroSSP Generic HLA Class I DNA Typing Kit	A*02 A*0201/02/+	A*26 A*2601/02/+	B*08 B*0801/04/+	B*15 B*1501/07/+	Cw*03 Cw*0303/11/+	Cw*07 Cw*0701/02/+				
	OneLambda MicroSSP Generic HLA Class II DNA Typing Kit							DRB1*14 DRB1*1402/05/+	DRB1*15 DRB1*1501/02/+	DQB1*03 DQB1*0301/04/+	DQB1*06 DQB1*0601/02/+
	Pel-Freez ABC SSP Unitrays	A*02 A*0201/02/+	A*26 A*2601/02/+	B*08 B*0801/05/+	B*15 B*1501/04/+	Cw*03 Cw*0303/11/+	Cw*07 Cw*0701/04/+				
	Pel-Freez DRDQ 2T SSP Unitrays							DRB1*14 DRB1*1402/06/+	DRB1*15 DRB1*1501/02/+	DQB1*03 DQB1*0301/04/+	DQB1*06 DQB1*0601/02/+
	Dynal AllSet SSP DR "low resolution"							DRB1*14 DRB1*1402/06/+	DRB1*15 DRB1*1501/02/+		
H1502R	OneLambda MicroSSP Japanese HLA class I and II ABCDRDQ DNA Typing Kit	A*25 A*2501/4301/6601/+	A*32 A*3201/02/+	B*44 B*4402/05/+	B*51 B*5101/03/+	Cw*01 Cw*0102/03/+	Cw*05 Cw*0501/02/+	DRB1*13 DRB1*1301/1416/+	DRB1*04 DRB1*0401/02/+	DQB1*03 DQB1*0302/05/+	DQB1*06 DQB1*0601/02/+
	MicroSSP HLA class I and II ABDR DNA Typing Kit	A*25 A*2501/02/+	A*32 A*3201/02/+	B*44 B*4402/03/+	B*51 B*5101/03/+			DRB1*13 DRB1*1301/02/+	DRB1*04 DRB1*0401/02/+		
	MicroSSP Generic HLA Class I DNA Typing Kit	A*25 A*2501/02/+	A*32 A*3201/02/+	B*44 B*4402/03/+	B*51 B*5101/03/+	Cw*01 Cw*0102/03	Cw*05 Cw*0501/02/+				
	OneLambda MicroSSP Generic HLA Class II DNA Typing Kit							DRB1*13 DRB1*1301/02/+	DRB1*04 DRB1*0401/02/+	DQB1*03 DQB1*0302/05/+	DQB1*06 DQB1*0601/02/+
	Pel-Freez ABC SSP Unitrays	A*25 A*2501/03/04	A*32 A*3201/02/+	B*44 B*4402/05/+	B*51 B*5101/02/+	Cw*01 Cw*0102/03/05	Cw*05 Cw*0501/02/+				
	Pel-Freez DRDQ 2T SSP Unitrays							DRB1*13 DRB1*1301/02/+	DRB1*04 DRB1*0401/02/+	DQB1*03 DQB1*0302/05/+	DQB1*06 DQB1*0601/02/+
	Dynal AllSet SSP DR "low resolution"							DRB1*13 DRB1*1301/02/+	DRB1*04 DRB1*0401/02/+		
H1503R H1504R H1506R	MicroSSP Japanese HLA class I and II ABCDRDQ DNA Typing Kit	A*02 A*0201/02/+	A*24 A*2402/03/+	B*46 B*4601/02	B*52 B*5201/05	Cw*01 Cw*0102/03/+	Cw*12 Cw*1202/1404/+	DRB1*08 DRB1*0801/03/+	DRB1*15 DRB1*1501/02/+	DQB1*06 DQB1*0601/02/+	-
	MicroSSP HLA class I and II ABDR DNA Typing Kit	A*02 A*0201/02/+	A*24 A*2402/03/+	B*46 B*4601/02	B*52 B*5201/05			DRB1*08 DRB1*0801/02/+	DRB1*15 DRB1*1501/02/+		
	OneLambda MicroSSP Generic HLA Class II DNA Typing Kit							DRB1*08 DRB1*0801/02/+	DRB1*15 DRB1*1501/02/+	DQB1*06 DQB1*0601/02/+	-
	MicroSSP Generic HLA Class I DNA Typing Kit	A*02 A*0201/02/+	A*24 A*2402/03/+	B*46 B*4601/02	B*52 B*5201	Cw*01 Cw*0102/03	Cw*12 Cw*1202				
	Pel-Freez ABC SSP Unitrays	A*02 A*0201/02/+	A*24 A*2402/03/+	B*46 B*4601/02	B*52 B*5201/02/03	Cw*01 Cw*0102/03/05	Cw*12 Cw*1202/08				
	Pel-Freez DRDQ 2T SSP Unitrays							DRB1*08 DRB1*0801/02/+	DRB1*15 DRB1*1501/02/+	DQB1*06 DQB1*0601/02/+	-
	Dynal AllSet SSP DR "low resolution"							DRB1*08 DRB1*0803/10/+	DRB1*15 DRB1*1501/02/+		
H1505R	MicroSSP Japanese HLA class I and II ABCDRDQ DNA Typing Kit	A*24 A*2402/03/+	-	B*52 B*5201/05	-	Cw*12 Cw*1202/1404/+	-	DRB1*15 DRB1*1501/02/+	-	DQB1*06 DQB1*0601/02/+	-
	MicroSSP HLA class I and II ABDR DNA Typing Kit	A*24 A*2402/03/+	-	B*52 B*5201/05	-			DRB1*15 DRB1*1501/02/+			
	MicroSSP Generic HLA Class I DNA Typing Kit	A*24 A*2402/03/+	-	B*52 B*5201	-	Cw*12 Cw*1202	-				
	OneLambda MicroSSP Generic HLA Class II DNA Typing Kit							DRB1*15 DRB1*1501/02/+	-	DQB1*06 DQB1*0601/02/+	-
	Pel-Freez ABC SSP Unitrays	A*24 A*2402/03/+	-	B*52 B*5201/02/03	-	Cw*12 Cw*1202/08	-				
	Pel-Freez DRDQ 2T SSP Unitrays							DRB1*15 DRB1*1501/02/+	-	DQB1*06 DQB1*0601/02/+	-
	Dynal AllSet SSP DR "low resolution"							DRB1*15 DRB1*1501/02/+	-		

表3 サンプル H1501/R の各市販キット別の反応とアサインメント結果(クラス II アリル)

Kit: OneLambda MicroSSP JPN		9	10	11	11	12	12	12	Local Assignment					
DNA Sample: H1501/R		B	B	C	B	H	F	D						
Laboratory	Lot #	71	79	86	87	89	91	93	DRB1		DRB3/4/5		DQB1	
003	Hospital	003	6	6	8	8	8	8	1401/02/05/+	1501/02/03/+	DRB3*01/02/03	DRB5*01/02/03	0301/04/09	0601/02/03/+
008	University	002	8	8	8	8	8	8	1401/02/+	1501/02/+	3*0101/02/+	5*0101/02/+	0301/04/09	0601/02/+
013	Blood Center	003	8	6	8	8	8	8	*1401/02/05/+	*1501/02/+	DRB4*01	DRB5*01/02	*0301/04/09/+	*06
015	Hospital	002	8	8	8	8	8	8	1401/02/05/+	1501/02/03/+	DRB3	DRB5	0301/04/09/+	0601/02/03/+
018	Typing Lab	002	8	8	8	8	8	8	1401/02/05/+	1501/02/03/+	DRB3*01/02/03	DRB5*01/02	0301/04/09	0601/02/03/+
031	Hospital	003	6	6	6	6	6	6						
052	Blood Center	003	6	6	8	8	8	8	DRB1*14	DRB1*15	DRB3*01/02/03	DRB5*01/02	DQB1*03	DQB1*06
064	Blood Center	003	6	6	8	8	8	8	*1401/02/05/+	*1501/02/03/+			*0301/04/09/+	*0601/02/03/+
067	Blood Center	003	8	8	8	8	8	8	1401/02/05/+	1501/02/03/+			0301/04/09/+	0601/02/03/+
Ave.		7.1	6.4	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8						

Kit: OneLambda MicroSSP AB/DR		10	11	12	12	11	Local Assignment					
DNA Sample: H1501/R		E	B	D	C	A						
Laboratory	Lot #	76	87	93	94	96	DRB1		DRB3/4/5			
016	Hospital	04A	8	8	8	8	DRB1*14	DRB1*15	DRB3*01/02/03	DRB5*01/02		
021	Hospital	04A	8	8	8	8	*14	*1501	DRB3*01-03	DRB5*01/02		
038	Institute	004	6	6	8	8	1402/03/05/+	1501/02/03/+	3 : 01/02/03	5 : 01/02		
047	Typing Lab	04A	8	8	8	8	1402/03/05/+	1501/02/03/+				
Ave.		7.5	7.5	8.0	7.5	8.0						

Kit: OneLambda MicroSSP 2L		1	2	3	3	4	4	4	Local Assignment					
DNA Sample: H1501/R		E	B	C	B	H	F	D						
Laboratory	Lot #	4	15	22	23	25	27	29	DRB1		DRB3/4/5		DQB1	
028	Typing Lab	005	8	8	8	8	8	8	1402/05/06/+	1501/02/03/+	B3*01/02/03	B5*01/02	0301/04/09/+	0601/02/03/+
043	Hospital	005	8	8	8	8	8	8	1402/05/06/+	1501/02/03/+	DRB3*0101/0202/+	DRB5*0101/02/03/+	0301/04/09/+	0601/02/03/+
058	Blood Center	005	8	8	8	8	8	8	#	*15011-11	\$		*03011-012/04/09-10	*06011-19
076	Hospital	005	8	8	8	8	8	8	1402/05/06/+	1501/02/03/+	DRB3*0101/02/03/+	DRB5*0101/02/03/+	0301/04/09/+	0601/02/03/+
Ave.		8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	#: *1402/0506/09/ 14/17-21/23/29-30/ 33/36		\$: DRB3*01011-08; *0201-11/13-14; *03011-03	: DRB5*01011-11N *0202-05		

Kit: Pel-Freez DRDQ 2T SSP UniTray		1	2	2	4	4	4	5	5	Local Assignment					
DNA Sample: H1501/R		C	C	C	C	F	H	B	C						
Laboratory	Lot #	3	11	15	27	30	32	34	35	DRB1		DRB3/4/5		DQB1	
006		018	6	6	6	8	8	8	8	1402/06/+	1501/02/+	DRB3*01/02/03	DRB5*01/02	0301/04/+	0601/02/+
023		018	8	8	8	8	8	8	8	*15	*14	3*01/02/03	5*01/02	*03	*06
Ave.		7.0	7.0	7.0	7.0	8.0	8.0	8.0	8.0						

Kit: Dynal AllSet DR SSP		1	3	3	3	3	Local Assignment							
DNA Sample: H1501/R		C	A	C	F	H								
Laboratory	Lot #	3	17	19	22	24	DRB1		DRB3/4/5					
014	Hospital		8	8	8	8	*1501	*1402						
029	Blood Center		8	8	8	8	*15	*14	3*01	5*01				
050	Hospital		8	8	8	8	1501/02/03/+	1402/06/13/+	B5*01/02	B3*01/02/03				
Ave.		8.0	8.0	8.0	8.0	8.0								

B*08 あるいは、B*0801/02/03+ が記入されておらず、“-” が記載されているのみであった。これは、5Hのプライマーセットの陰性反応によるものと思われるが、B*08 アリルは6D, 7F, 8F, 9B および9Aのプライマーセットも陽性になり、それらの反応はサンプル H1501/R のもう一つの HLA-B アリルである B*1501 とオーバーラップしないことから、十分に判定できるアリルであると考えられる。また、コンピュータ判定を使用した場合、5Hが陰性であっても B*15 と B*08 が判定される。HLA の DNA タイピングを実施し、ひとつの遺伝子座に1つのアリルしか検出されなかった場合は、トレーのプライマー未加工、DNA 溶液の不均一などによるエラーを考慮し、ロットを変えた再検査ないし他の方法論を利用したキットを用いて検査するべきである。

Pel-Freez 社製の ABC SSP Unitray については、ウエルポジション 3C に偽陽性が 10D に偽陰性反応がそれぞれみられたが、アサインメントに問題となるようなものでなかった(表 1d)。しかし、10D については参加施設数が少ないものの半数が偽陰性反応を示していることから、このプライマーセットがスレッシュホールド(閾値)を少し超えたところにあるため、増幅産物の急激な増加前に観察されている可能性がある。それにより、PCR の効率などによって陽性になるべきものが陰性になってしまう。この反応性の低さを改善するためには、増幅が規定回数よりも 5, 6 回前に立ち上がるような効率の良いプライマーシーケンスに変更する必要がある。

一般的に使用されている SSP 法に基づくキットは、基本的に low resolution の検査を目的として作

表4 サンプル H1502/R の各市販キット別の反応とアサインメント結果(クラス I アリル)

Kit: OneLambda MicroSSP JPN DNA Sample: H1502/R		1	2	2	2	3	4	4	7	7	7	8	8	8	8	Local Assignment						
Laboratory	Lot #	B	F	C	B	A	F	C	E	C	A	C	G	A	C	HLA-A		HLA-B		HLA-C		
008	University #002	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1	1	2501/02/+	3201/02/+	5101/03/+	4402/05/11	0102/03	0501/02	
015	Hospital #002	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1	1	2501/02/07/+	3201/02/03	4402/03/05/+	5101/03/07/+	0102/03	0501/02	
022	University #002	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1	1	25/26/43/66	3201/02/03	4402/03/05/+	5101/03/07/+	0102/03	0501/02	
003	Hospital #003	8	8	8	8	8	6	8	8	8	8	8	6	1	1	2501/02/03/+	3201/02/03/+	4402/05/11/+	5101/03/07/+	0102/03/05/+	0501/02/03/+	
013	Blood Center #003	8	8	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6	1	1	*25:66,*4301,*2607	*3201/02/+	*44021/022/05/+	*5101/03/07/+	*0102/03/05/+	*0501/02/+	
031	Hospital #003	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	1	1							
052	Blood Center #003	8	8	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6	1	1		A*25	A*32	B*44	B*51	Cw*01	Cw*05
064	Blood Center #003	8	8	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6	1	1	*2501/02/03/+	*3201/02/03/+	*4402/03/05/+	*5101/03/07/+	*0102/03/05/+	*0501/02/03/+	
067	Blood Center #003	8	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	1	1	25/26/43/+	3201/05	5101/03/18/+	4402/03/05/+	0102/03/05/+	0501/02/03/+	
039	Hospital #003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1	1	*2501/02/03/+	*3201/02/03/+	*4402/03/04/+	*5101/03/07/+	*0102/03/05/+	*0501/02/03/+	
018	Typing Lab #002	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1	1	2501/02	3201/02/03	5101/02/03/+	4402/03/05/+	0102/03/05	-	
028	Typing Lab #003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1	1	2501/2607/+	3201/02/03/+	nt	nt	nt	nt	
Ave.		7.8	7.8	7.6	7.3	6.2	6.5	7.6	7.6	7.6	7.6	7.3	6.8									

Kit: OneLambda MicroSSP AB/DR DNA Sample: H1502/R		2	2	3	4	4	4	5	5	7	9	Local Assignment				
Laboratory	Lot #	H	G	G	H	G	F	E	H	G	A	A	HLA-A		HLA-B	
016	Hospital #04A	8	8	8	8	8	8	6	8	8	8	8	A*25	A*32	B*44	B*51
021	Hospital #04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*25	*32	*44	*51
038	Institute #04A	6	8	6	8	8	8	6	8	8	8	8	2505.2.4	3201/02/03/+	4402/03/07/+	5101/03/07/+
047	Typing Lab #04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	2501/02/03	3201/02/03/+	4402/03/06/+	5101/03/07/+
059	Hospital #04A	8	8	8	8	8	8	6	6	8	8	8	2501/02/03/+	3201/02/03/+	4402/03/07/+	5101/03/07/+
Ave.		7.5	8.0	7.5	8.0	8.0	8.0	6.5	6.5	7.5	8.0	8.0				

Kit: OneLambda MicroSSP 1L DNA Sample: H1502/R		2	2	3	4	4	4	5	5	8	10	10	10	11	12	Local Assignment						
Laboratory	Lot #	G	F	F	G	F	F	E	D	G	F	E	D	B	A	A	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
012	Hospital #04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*2501/02/03/+	*3201/02/03/+	*44	*51	*0102/03/06	*0501/02/03/+
043	Hospital #04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	2501/02/03/+	3201/02/03/+	4402/03/07/+	5101/03/07/+	0102/03	0501/02/03/+
045	Blood Center #04A	6	8	6	8	8	6	6	8	8	8	8	8	8	8	8	*25	*32	*51	*44	*05	*01
064	Blood Center #004	8	8	8	nt	→											*2501/02/03/+	*3201/02/03/+	*5101/03/07/+		nt	nt
076	Hospital #04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	2501/02/03/+	3201/02/03/+	4402/03/07/+	5101/03/07/+	0102/03	0501/02/03/+
050	Hospital #004	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	nt	→			2501/02/03	3201/02/03/+	4402/03/07/+	5101/03/07/+	nt	nt
058	Blood Center #004	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	A*2501-03	A*3201-03/05-07	#	\$	Cw*0102-03	Cw*0501-04
068	Blood Center #04A	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	*25	*32	*44	*51	*01	*05
Ave.		7.8	7.8	7.5	7.7	7.7	7.4	7.7	7.7	8.0	7.7	8.0	8.0	7.3	7.7	# Bw*44021-022 031-032/071/11 13/19N22-24/26-27				\$ B*51011-014/03/07 11N-12/14/16/18/24- 27N		

Kit: Pel-Freez ABC SSP UniTray DNA Sample: H1502/R		1	2	4	7	7	8	8	9	10	10	11	12	Local Assignment					
Laboratory	Lot #	H	E	A	D	E	D	E	G	B	H	D	G	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
004	Blood Center 028	8	6	8	8	8	8	8	8	6	6	6	6	2501/03/04	3201/02/03/+	4402/05/11/+	5101/02/03/+	0102/03/05	0501/02/03/+
006	Maker 028	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3201/02/+	2501/03/04	4402/05/+	5101/02/+	0102/03/05	0501/02/+
014	Hospital 027	8	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*2501/03	*3201/02/03/+	*4402/05/11/+	*5101/02/03/+	*0102/03/05	*0501/02/03/+
023	Hospital 028	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*25	*32	*44	*51	*01	*05
Ave.		7.5	6.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.0	7.0	7.0	7.5						

製されているため、一部を除いて2桁でのアサインメントしか可能でない。それにもかかわらず、複数の施設において4桁表示でのアサインメントがみかけられた。このようなアサインメント方法は大きな誤りであり、今後は正されなければならない。今回のQCで配布されたDNA溶液を用いた検査結果によるアサインメントとして日本組織適合性学会が推奨している表記法に基づいた表記を表2にまとめて記載した。

1-2. HLA クラス II タイピング(表3)

どの市販キットについても問題となるような反応はほとんど見かけられなかった。

2. サンプル #H1502/R

2-1. クラス I タイピング(表4)

H1502/Rについては、OneLambda社製のMicroSSP Japanese HLA Class I and II ABCDRDQ DNA

Typing Kit (MicroSSP JPN) のウエルポジション 2A, 3F, 7A と 8C に偽陰性反応が、5G と 6F に偽陽性反応がそれぞれ見られた(表4a)。5G と 6F それぞれの7Cの反応は B*58 アリルを決定するもので、特に5Gのプライマーセットは B*58 に特異的である。このような特異的なプライマーセットに偽陽性反応が見られるのは問題であると思われた。

偽陰性反応を示したウエルポジション 2A, 3F, 7A と 8Cのうち、特に2Aの反応性が全体的にかなり低いものであった(表4a)。スコア8が11施設中5施設で45%、スコア6が3施設で27%、スコア4が2施設で18%、スコア2が1施設で9%であった。このことから、ここで使用されているプライマーセットのスレッシホールドが規定の増幅回数近くに位置するために生じたものと推測される。この反応性の低さを改善するためには、効率の良いプライマーシーケンスに変更する必要がある。

ウエルポジション 3Fの偽陰性反応は、7E と 7C

表5 サンプル H1502/R の各市販キット別の反応とアサインメント結果(クラス II アリル)

Kit: OneLambda MicroSSP JPN DNA Sample: H1502/R		10	10	10	11	11	12	12	Local Assignment							
Laboratory		Lot #	G	D	C	B	A	H	F	C	DRB1		DRB3/4/5		DQB1	
003	Hospital	003	8	8	8	8	8	8	8	8	0401/02/03/+	1301/02/03/+	DRB3*01/02/03	DRB4*0101/02/03/+	0302/04/07/+	0601/02/03/+
008	University	002	8	8	8	8	8	8	8	8	0401/03/+	1301/02/+	4*0101/02/+	3*0101/02/+	0302/05/+	0601/02/+
013	Blood Center	003	6	6	6	6	6	6	6	6	*04032/05/06/+	*1301/02/+*1416/25/37	DRB3*01/02/03	DRB4*01	*0302/05/07/+	*06
015	Hospital	002	8	8	8	8	8	8	8	8	0401/02/03/+	1301/02/03/+	DRB3	DRB4	0302/05/07/+	0601/02/03/+
018	Typing Lab	002	8	8	8	8	8	8	8	8	0401/02/03/+	1301/02/03/+	DRB3*01/02/03	DRB4*0101/02/03/+	0302/05/07/+	0601/02/03/+
022	University	002	8	8	8	8	8	8	8	8	0401/02/03/+	1301/02/03/+	DRB4*01/02/03/+	DRB3*01/02/03	0601/02/03/+	0302/05/07/08
031	Hospital	003	6	6	6	6	6	6	6	6						
039	Hospital	003	8	8	8	8	8	8	8	8	*0403/05/06/+	*1301/02/06/+				
052	Blood Center	003	8	8	6	8	8	8	8	8	DRB1*04	DRB1*13	DRB3*01/02/03	DRB4*01	DQB1*03	DQB1*06
064	Blood Center	003	8	8	6	8	8	8	8	8	*0401/02/03/+	*1301/02/03/+			*0302/05/07/+	*0601/02/03/+
067	Blood Center	003	8	8	6	8	8	8	8	8	0401/02/03/+	1301/02/03/+			0601/02/03/+	0302/05/07/+
Ave.			7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6						

Kit: OneLambda MicroSSP AB/DR DNA Sample: H1502/R		11	11	11	12	12	12	Local Assignment				
Laboratory		Lot #	H	E	D	C	B	A	DRB1		DRB3/4/5	
016	Hospital	04A	8	8	8	8	8	8	DRB1*04	DRB1*13	DRB3*01/02/03	DRB4*01
021	Hospital	04A	8	8	8	8	8	8	*04	*13	DRB3*01-03	DRB4*01
038	Institute	004	8	8	8	6	8	8	0401/02/03/+	1301/02/03/+	3 : 01/02/03	4 : 0101/02/03/+
047	Typing Lab	04A	8	8	8	8	8	8	0401/02/03/+	1301/02/03/+		
Ave.			8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0				

Kit: OneLambda MicroSSP 2L DNA Sample: H1502/R		2	2	2	3	3	4	4	4	Local Assignment						
Laboratory		Lot #	H	E	D	B	A	H	F	C	DRB1		DRB3/4/5		DQB1	
028	Typing Lab	005	8	8	8	8	8	8	8	8	0401/02/03/+	1301/02/03/+	B4*01/02/03	B3*01/02/03	0302/05/07/+	0601/02/03/+
043	Hospital	005	8	8	8	8	8	8	8	8	0401/02/03/+	1301/02/03/+	DRB3*0101/0201/+	DRB4*0101/02/03/+	0302/05/07/+	0601/02/03/+
058	Blood Center	005	8	8	8	8	8	8	8	8	*04011-14/16-42	#	DRB4*01011-05	\$	*0302/05/07-08	*06011-19
076	Hospital	005	8	8	8	8	8	8	8	8	0401/02/03/+	1301/02/03/+	drb4*0101/02/03/+	drb3*0101/02/03/+	0302/05/07/+	0601/02/03/+
Ave.			8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	#: *13011-04/12/15-16 /21-23/28/30-36 /38-40/48-49		\$: DRB3*01011-08 *0201-11/13-14 *03011-03			

Kit: Pel-Freez DRDQ 2T SSP UniTray DNA Sample: H1502/R		1	2	2	4	4	4	5	5	Local Assignment						
Laboratory		Lot #	G	B	C	C	D	H	D	E	DRB1		DRB3/4/5		DQB1	
006	Company	018	6	6	6	6	6	6	6	6	0401/02/+	1301/02/+	DRB3*01/02/03	DRB4*01/02/03	0302/05/+	0601/02/+
023	University	018	8	8	8	8	8	8	8	8	*04	*13	3*01/02/03	4*01/02	*03	*06
Ave.			7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0						

Kit: Dynal AllSet DR SSP DNA Sample: H1502/R		1	2	2	3	3	3	Local Assignment				
Laboratory		Lot #	H	G	H	A	F	G	DRB1		DRB3/4/5	
014	Hospital		8	8	8	8	8	8	*0404	*1302		
029	Blood Center		8	8	8	8	8	8	*04	*13	3*01/02/03	4*01
050	Hospital		8	8	8	8	8	8	0401/02/03/+	1301/02/04/+	B4*01	B3*01/02/03
Ave.			8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0				

の反応でカバーしているため、B*44のアサインメントに直接的な影響を及ぼすのに至っていなかった。しかし、7Aと8Cの偽陰性反応は、Cw*01とCw*05のアサインメントに直接的な影響を及ぼすため、アサインメントのできていない施設が一部で見かけられた。このように一組のプライマーセットでアリルを決定するような反応についてはハプロタイプなどを考慮し、矛盾があれば、再検査などを考えるべきである。

MicroSSP JPN のウエルポジション 1B プライマーセットは、A*25のみならず A*4301や A*6601/04とも反応するため、A*25のみを単独でアサインメントできないはずである。それにもかかわらず、複数の施設で A*25のみをアサインしていた。判定表の見方やアサインメントの方法について今一度考える必要性があると思われた。

MicroSSP 1L のウエルポジション 4D に位置するプライマーセットの反応性が低く、スコア 4 が 7 施設中 3 施設、スコア 1 が 1 施設にそれぞれ見られ、スコアの平均値は 5.3 であった(表 4c)。このことから、このプライマーセットのスレッシホールドが規定の増幅回数付近に位置するため、直線的な増幅に入る前に観察している可能性が考えられる。この反応性の低さを改善するためには、増幅が規定回数よりも 5, 6 回前に立ち上がるような効率の良いプライマーシーケンスに変更する必要がある。

2-2. クラス II タイピング(表 5)

MicroSSP JPN のウエルポジション 10C でスコア 1 が 11 施設中 2 施設、スコア 6 が 4 施設でそれぞれ報告されていた(表 5a)。偽陰性あるいは弱陽性になりやすいプライマーセットである。これにより、

表 10 サンプル H1503/R の各市販キット別の反応とアサインメント結果(クラス II アリル)

Kit: OneLambda MicroSSP JPN DNA Sample: H1503/R		9	11	11	12	Local Assignment																	
Laboratory		Lot #	71	83	86	91	92	94	95	97	99	DRB1				DRB3/4/5				DQB1			
003	Hospital	003	8	6	8	8	1	1	1	1	1	0803/05/08/+	1501/02/03/+	DRB5*01/02/03	-	0601/02/03/+	-						
008	University	002	8	8	8	8	1	1	1	1	1	1501/02/+	0801/032/+	5*0101/02/+		0601/02/+							
015	Hospital	002	8	8	8	8	1	1	1	1	1	0801/03/05/+	1501/02/03/+	DRB5	-	0601/02/03/+	-						
018	Typing Lab	003	8	8	8	8	1	1	1	1	1	0803/05/06/+	1501/02/03/+	DRB5*01/02		0601/02/03/+	-						
031	Hospital	003	6	6	6	6	1	1	1	1	1												
052	Blood Center	003	8	6	8	8	1	2	1	1	1	DRB1*08	DRB1*15	DRB5*01/02		DQB1*06	-						
064	Blood Center	003	6	6	8	8	1	1	1	1	1	*0803/05/06/+	*1501/02/03/+			*0601/02/03/+							
067	Blood Center	003	8	6	8	8	1	1	1	1	1	0801/03/05/+	1501/02/03/+			0601/02/03/+							
Ave.			7.5	6.8	7.8	7.8																	

Kit: OneLambda MicroSSP AB/DR DNA Sample: H1503/R		10	12	12	Local Assignment												
Laboratory		Lot #	76	90	93	DRB1				DRB3/4/5				DQB1			
016	Hospital	04A	8	8	8	DRB1*08	DRB1*15	DRB5*01/02	-								
021	Hospital	04A	8	8	8	*08	*1501	DRB5*01/02									
038	Institute	004	8	6	8	0801/02/03/+	1501/02/03/+	5 : 01/02									
047	Typing Lab	04A	8	8	8	0801/02/03/+	1501/02/03/+										
Ave.			8.0	7.5	8.0												

Kit: OneLambda MicroSSP 2L DNA Sample: H1503/R		1	3	3	4	4	Local Assignment												
Laboratory		Lot #	4	19	22	27	31	DRB1				DRB3/4/5				DQB1			
208	Typing Lab	005	8	8	8	8	8	1501/02/03/+	0801/02/03/+	B5*01/02				0601/02/03/+	-				
043	Hospital	005	8	8	8	8	8	0801/02/03/+	1501/02/03/+	DRB5*0101/02/03/+				0303/06/12	0601/02/03/+				
058	Blood Center	005	6	6	8	6	8	#	*15011-11	DRB5*010111-11N*0202-05				*06011-19					
076	Hospital	005	8	8	8	8	8	0801/02/03/+	1501/02/03/+	drb5*0101/02/03/+				0303/06/12	0601/02/03/+				
Ave.			7.5	7.5	8.0	7.5		# : *0801-08/10-16 #18-19/22-23											

Kit: Pel-Freez DRDQ 2T SSP UniTray DNA Sample: H1503/R		1	3	4	4	Local Assignment												
Laboratory		Lot #	3	18	30	32	DRB1				DRB3/4/5				DQB1			
006	Company	018	6	8	8	8	0801/02/+	1501/02/+	DRB5*01/02				0601/02/+	-				
023	University	018	8	8	8	8	*15	*08	5*01/02				*06					
Ave.			7.0	6.0	8.0	8.0												

Kit: Dynal AllSet DR SSP DNA Sample: H1503/R		1	2	3	Local Assignment												
Laboratory		Lot #	3	10	24	DRB1				DRB3/4/5				DQB1			
014	Hospital	550.21	8	8	8	*1502	*0803										
029	Blood Center	H583	8	8	8	*15	*08	5*01	-								
050	Hospital	A764	6	6	8	1501/02/03/+	0803/10/12/+	B5*01/02									
Ave.			7.3	7.3	8.0												

施設のみにはしか見られないことから、一部を除き技術的な問題によるものと推測された。しかし、ウェルポジション 4D は、半数以上の施設で反応性が弱いことから、プライマーシーケンスの改良が必要かもしれない。

DNA 濃度が 10^{-1} 違うということは、PCR 回数にして理論上 3.32 回余分に増幅する必要がある(図 1)。しかし、PCR 効率の関係から、実際に肉眼的に観察されるのに 4.55 回余分に増幅しなければならない(図 2)。100 ng の DNA を鋳型として PCR を実施した場合、一般的なプライマーセットは、増幅が 24 回ぐらいを過ぎたところから肉眼的に増幅産物を確認できるようになる(図 3)。そのため、30 回の増幅では、10 ng (1/10 量)の DNA までが観察可能となる。実際のキットで使用される DNA 量は、70~100 ng 程度であるので、10 分の 1 程度の DNA 量であれば十分に 30 回の増幅で観察されるはずである。また、増幅像の濃淡に差はほとんどみられない

はずである。しかし、H1503/R よりも H1504/R の方が反応性の弱いプライマーセットは、PCR 効率が他のものに比して悪いため、規定の増幅回数よりも 4 回ほど少ないところで通常の DNA 量が観察できるようになっている。そのため、10 分の 1 量の DNA 量のアリルが観察できるようになるのが規定回数ぎりぎりとなり、増幅産物が観察される場合と観察されない場合が発生する。増幅効率はプライマーセットにより異なり、非常に早くから観察できるものから規定回数ぎりぎりにならないと観察できないものまでキットには混在している(図 4)。しかし、増幅回数をさらに増やすと偽陽性反応が生じるプライマーセットが含まれるため、その中間に規定回数が設定されていることが多いと推測される。

H1504/R の反応性が H1503/R よりも低い施設は、H1503/R についても反応性が低い傾向であった。これは、技術的な問題によって生じている可能性が考えられる。

表 11 サンプル H1504/R の各市販キット別の反応とアサインメント結果(クラス II アリル)

Kit: OneLambda MicroSSP JPN H1504/R		9	11	11	12	Local Assignment															
		B	F	C	F	A	G	B	B	DRB1				DRB3/4/5				DQB1			
Laboratory	Lot #	71	83	86	91	72	74	79	95												
003	Hospital	003	8	8	8	1	1	1	1	1501/02/03/+	-	DRB5*01/02/03	-	-	0601/02/03/+	-	-	-			
008	University	002	8	8	8	8	1	1	1	1501/02/+	0801/032/+	5*0101/02/+	-	-	0601/02/+	-	-	-			
015	Hospital	002	8	8	8	8	1	1	1	0801/03/05/+	1501/02/03/+	DRB5	-	-	0601/02/03/+	-	-	-			
018	Typing Lab	003	8	8	8	8	1	1	1	0803/05/06/+	1501/02/03/+	DRB5*01/02	-	-	0601/02/03/+	-	-	-			
031	Hospital	003	6	6	6	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
052	Blood Center	003	6	8	8	1	2	1	1	DRB1*08	DRB1*15	DRB5*01/02	-	-	DQB1*06	-	-	-			
064	Blood Center	003	8	8	8	1	1	1	1	*1501/02/03/+	-	-	-	-	*0601/02/03/+	-	-	-			
067	Blood Center	003	8	8	8	1	1	1	1	0801/03/05/+	1501/02/03/+	-	-	-	0601/02/03/+	-	-	-			
013	Blood Center	003	6	6	6	1	1	1	1	*0803/05/+	*1501/02/+	DRB5*01/02	-	-	*06	-	-	-			
022	University	002	8	8	8	1	1	1	1	1501/02/05/+	0801/03/05/+	DRB5*01/02	-	-	0601/02/03/+	-	-	-			
048	Hospital	003	8	8	8	1	1	1	1	DRB1*1501/02/05/+	DRB1*0801/03/05/+	DRB5*0101/02	-	-	DQB1*0303/06	DQB1*0601/03/04/+	-	-			
Ave.		7.5	7.6	7.6																	

Kit: OneLambda MicroSSP AB/DR DNA Sample: H1504/R		10	12	12	Local Assignment												
		E	G	D	DRB1				DRB3/4/5				DQB1				
Laboratory	Lot #	76	90	93													
016	Hospital	04A	8	8	8	DRB1*08	DRB1*15	DRB5*01/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
021	Hospital	04A	8	8	8	*08	*1501	DRB5*01/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
038	Institute	004	8	6	8	0801/02/03/+	1501/02/03/+	5 : 01/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
047	Typing Lab	04A	8	6	8	0801/02/03/+	1501/02/03/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ave.		8.0	6.5	8.0													

Kit: OneLambda MicroSSP 2L DNA Sample: H1504/R		1	3	3	4	4	Local Assignment											
		E	F	C	F	B	DRB1				DRB3/4/5				DQB1			
Laboratory	Lot #	4	19	22	27	31												
028	Typing Lab	005	8	8	8	8	0801/02/03/+	1501/02/03/+	B5*01/02	-	-	-	0601/02/03/+	-	-	-	-	
043	Hospital	005	8	8	8	8	0801/02/03/+	1501/02/03/+	DRB5*0101/02/03/+	-	-	-	0303/06/12	0601/02/03/+	-	-	-	
058	Blood Center	005	6	6	6	6	#	*15011-11	DRB5*01011-11N*0202-05	-	-	-	*06011-19	-	-	-	-	
076	Hospital	005	8	8	8	8	0801/02/03/+	1501/02/03/+	drb5*0101/02/03/+	-	-	-	0303/06/12	0601/02/03/+	-	-	-	
030	Typing Lab	004	8	6	8	8	0801/02/03/+	1501/02/03/+	B5*0101/02/03/+	-	-	-	0303/06/12	0601/02/03/+	-	-	-	
Ave.		7.6	6.4	7.6	7.6													

#: *0801-08/10-16 /18-19/22-23

Kit: Pel-Freez DRDQ 2T SSP UniTray DNA Sample: H1504/R		1	3	4	4	Local Assignment											
		C	B	F	H	DRB1				DRB3/4/5				DQB1			
Laboratory	Lot #	3	18	30	32												
006	Company	018	6	8	8	0801/02/+	1501/02/+	DRB5*01/02	-	-	-	0601/02/+	-	-	-	-	-
023	University	018	8	8	8	*08	*15	5*01/02	-	-	-	*06	-	-	-	-	-
Ave.		7.0	8.0	8.0													

Kit: Dynal AllSet DR SSP DNA Sample: H1504/R		1	2	3	Local Assignment												
		C	B	H	DRB1				DRB3/4/5				DQB1				
Laboratory	Lot #	3	10	24													
014	Hospital		8	8	*1502	*0803	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
029	Blood Center		8	8	*15	*08	5*01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
050	Hospital		8	8	1501/02/03/+	0803/10/12/+	B5*01/02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ave.		8.0	7.3	8.0													

3-2. HLA クラス II タイピング(表 10, 表 11)

MicroSSP JPN の DRB1*08 を決定するウエルポジション 11F のプライマーセットの反応性は、平均スコアが 4.6 と低く、スコア 1 ないし 2 を示した施設が 11 施設中 3 施設、スコア 4 が 4 施設であった(表 10a)。このウエルポジション 11F の反応性は、1503/R で多少低いもののアサインメントに問題となるようなものでなかった。しかし、H1504/R の反応性は非常に弱いものであった。このことから、このプライマーセットのスレッシホールドが規定の増幅回数の近くにあるため、完全な増幅の起こる前に観察されているものと考えられる。この反応性の低さを改善するためには、増幅が規定回数よりも最低 5 回程度前に立ち上がるような効率の良いプライマーシーケンスに変更する必要がある。

また、MicroSSP JPN は、複数プライマーセット

で偽陽性反応が見かけられた(表 10a)。その反応に施設間での共通性がほとんど見られなかったことから、技術的な問題によるものと推測された。

OneLambda 社製の MicrpSSP Generic HLA Class II DNA Typing Kit (MicroSSP 2L) のウエルポジション 4B の反応性が 4 施設中 2 施設で H1503/R と H1504/R とともに偽陽性を示していた(表 10c)。このプライマーセットは、DQB1*0303/06/+ を決定する唯一のものであることから、これらの施設ではこのアリルがアサインされていた。ただし、ハプロタイプなどを考慮し、再検査などを行っていただければ問題なくアサインできたものと思われる。

サンプル H1506/R については、実施した施設が少ないことと、無理な操作により PCR 増幅を実施しているため、検査自体に問題があり、評価対象から外した。

4. サンプル #H1505/R

H1505/R については、実施した施設が少ないこと

と、無理な操作により PCR 増幅を実施しているため、検査自体に問題があり、評価対象から外した。

第7回 HLA-QC ワークショップレポート —方法論別生データ検討—その他 (RFLP, SBT, SSCP, RSCA)—

柏瀬貢¹⁾、太田正穂²⁾、小林 賢³⁾、酒巻建夫⁴⁾、佐田正晴⁵⁾、田中秀則¹⁾、
中島文明⁶⁾、成瀬妙子⁷⁾、丸屋悦子⁸⁾、安波道郎^{9,10)}、木村彰方^{9,10)}
(日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会)

1) 東京都赤十字血液センター検査部, 2) 信州大学医学部法医学, 3) 防衛医科大学校検査部, 4) 国立佐倉病院 HLA 検査室, 5) 国立循環器病センター研究所, 6) 神奈川県赤十字血液センター検査部, 7) 東海大学医学部分子生命科学系, 8) 特定非営利活動法人 HLA 研究所, 9) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, 10) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所ゲノム多様性研究室

1. はじめに

RFLP (restriction fragment length polymorphism), SBT (sequence based typing), SSCP (single-strand conformation polymorphism), RSCA (reference strand-mediated conformation analysis) 法はいずれも高精度タイピング法と言われている。

今回のワークショップのサンプルの特徴は、以下の3点が挙げられる。

① 正確なタイピング

→ 外国人由来の rare なアリルを持ったサンプル

② 奇妙なデータが得られるタイピング

→ 片側染色体上遺伝子の欠損 (LOH) のサンプル

③ 少量 DNA からのタイピング

→ ろ紙にスポットした少量 DNA のサンプル

今回のワークショップのサンプルがそれぞれ4種類の方法を用いた場合、どのような点で優れているのかあるいは限界があるのか、各施設から提出されたデータを基に解析を行った。

2. 参加施設・方法

今回、データを提出された施設数を方法毎に図1

に示した。

RFLP 法は主に HLA-DRB1, DQB1, DPB1 タイピングで用いられていた。SBT 法は主に HLA-A, B, DRB1 タイピングで用いられており、ほとんどの施設が市販キットを使用していた。SSCP 法は主に HLA-DRB1 タイピングで用いられており、すべての施設が自家製試薬によりタイピングが行われていた。2施設が HLA-A, B, DRB1 を RSCA 法によりタイピングが行われていた。

3. 反応・判定結果および問題点

各方法の問題点や特徴について各施設から提出されたコメントを図2-図5に示した。

RFLP 法は必ずしも変異に対する制限酵素が存在するとは限らないため、H1501 では DRB1*1501 と DRB1*1503 の区別が不可能であった。(図2)

SBT 法は最も高精度のタイピング法と呼ばれているが各染色対上の HLA 遺伝子配列の区別を一般的に行っていないため、ambiguity が存在することの認識が必要である。そのため、H1501 では DPB1*0401, 0402 と 2301, 5101 の区別は不可能であった。(図

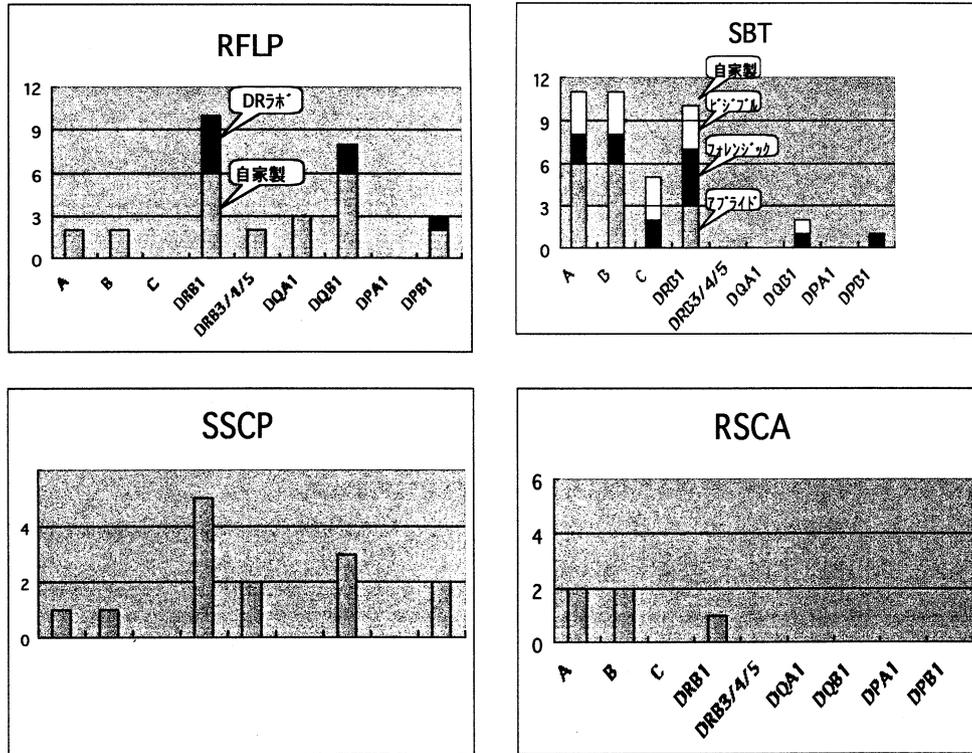


図1 方法別施設数

①変異に対する制限酵素が存在せず

H1501R : DRB1*1501 v s
1503

②同一グループ内での増幅が不均一

施設コード 037 : H1502R : B*5101, blank (B*4402)

③LOH様サンプルが困難

施設コード 037 : H1505R : A*2402, blank (A*0207)
H1505R : B*5201, blank (A*4601)

図2 RFLPの判定結果および問題点

① Ambiguityが存在する

DPB1*0401,0402/DPB1*2301,5101

② PCR増幅が十分でない場合、波形の信頼性が低い

③コンタミやキミズム様のサンプルが認識できる

H1503RのHLA-Aについては、コード123の2番目の塩基がT, G, Aの3つのピークが見られたため、02011, 0207, 24021が混在していると考えた。

④正確性はライブラリーの信頼性に大きく関与

ABI社の解析ソフト「Match Tool」のライブラリーのミス
A*0212→A*021

図3 SBTの判定結果および問題点

3)

図4に今回SSCP法を用いてDRB1のタイピングを行った施設の電気泳動条件を示した。施設間差があることで、区別可能なアレルが施設毎に異なることが考えられる。また、SSCP法の限界として、標準DNAが存在せずにタイピングを行った場合、正確な検査結果が得られない。そのため、H1501のDRB1*1402はrareなアレルであり標準DNAの入手が困難なため、他のアレルと区別できない施設があった。

手が困難なため、他のアレルと区別できない施設があった。

RSCA法の特徴は、増幅量を数値化し易いことが挙げられる。今回、LOHを模したサンプルではアレル間の増幅量が数値化されたデータが提出された。この様にLOH(様)のサンプルなどには威力を発揮する方法と思われた。しかしながら、H1501のA*2601とA*2602が区別できなかったことから、

①標準DNAが存在せず

H1501R:DRB1*1501、1402?

②電気泳動条件の施設間差

(DRB1の電気泳動条件)

	アクリルアミド/ ビスアクリルアミド	ホリアクリルアミド [*] ゲル濃度(%)	グリセリン濃度(%)	温度(°C)
施設A	49:1	10	0	22
施設B	49:1	10、12.5	5	22
施設C	?	12	10	22
施設D	49:1	12	5	22
施設E	24:1	10	0	25

図4 SSCPの判定結果および問題点

①分解能が低い

H1501R : A*2601と2602区別不可

②正確性が低い

施設コード006 : H1505 : B*4601 (5201) 事務的ミス?

施設コード077 : H1501R : B*1528 (1501)

③LOH様サンプルに対し増幅量が数値化し易

い 施設コード006 :

H1504の検体は、H1503ないしH1506を約14%ほどコンタミさせたものと推定

図5 RSCAの判定結果および問題点

現在市販されているキットでは4桁レベルの十分な分解能が未だ得られていないと思われた。(図5)

4. まとめ

近年、DNA タイピングが日常検査として定着し、飛躍的にアレルの種類が増加の一途をたどっている。HLA の DNA タイピングは複数の方法を併用する

ことで高精度の結果が得られる。しかし、すべてのサンプルを必ず複数の方法によりタイピングすることは不可能である。場合によっては他の方法と組み合わせることでタイピング結果を得ることも必要と思われる。それぞれの方法の特徴や限界を理解して始めてその選択が可能で、正確かつ合理的なタイピングが可能と思われる。

第7回 HLA-QC ワークショップレポート —濾紙サンプルからのタイピング評価—

太田正穂¹⁾, 柏瀬貢一²⁾, 小林 賢³⁾, 酒巻建夫⁴⁾, 佐田正晴⁵⁾, 田中秀則²⁾,
中島文明⁶⁾, 成瀬妙子⁷⁾, 丸屋悦子⁸⁾, 安波道郎^{9,10)}, 木村彰方^{9,10)}
(日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会)

- 1) 信州大学医学部法医学, 2) 東京都赤十字血液センター検査部, 3) 防衛医科大学校検査部, 4) 国立佐倉病院 HLA 検査室, 5) 国立循環器病センター研究所, 6) 神奈川県赤十字血液センター検査部, 7) 東海大学医学部分子生命科学系, 8) 特定非営利活動法人 HLA 研究所, 9) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, 10) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部ゲノム多様性研究室

1. はじめに

HLA-DNA タイピングを行っている検査室や研究室では、数多くのタイピング法の中からその目的、用途に応じた最も適した方法を用いて検査を行っている。検査には、通常末梢血から抽出した良質のDNAを用いているが、骨髄移植後患者や個人識別用

検体等では、時に血液以外の試料(毛髪, 爪, 口腔粘膜等)からタイピングをしなければならないことに遭遇する。このようなときには十分な量のDNAサンプルを入手することが不可能で検査法も限られたものになる。また、検査を他施設に依頼するときに採決した血液以外のサンプルを送るケースも増えてき

ている。今回の HLA-DNA タイピング QC ワークショップでは、このような事情を考慮し、濾紙に添付した DNA 試料から HLA タイピングを行い、その結果について検討した。

2. 検査試料・DNA 抽出法

参加施設には、2種類の細胞株より抽出した DNA (約 300 ng) を 5 mm の濾紙 (IsoCode, Schleicher & Schuell 社) にスポットしたもの各 2 枚を送付し、そのうち一枚を検査に使用することにした。DNA 抽出は、濾紙使用説明書に記載されているプロトコルに準じ QCWS 担当部会で作製した標準プロトコル (表 1) に従って行うことを薦めた。濾紙使用説明書には、IsoCode の DNA 回収率は 60% と記載されていることから、理論的には 300 ng のスポットからは 180 ng の DNA が回収されることになる。

3. 結果

1) サンプル 1505R 判定に参加した施設数と判定一致率

サンプル 1505R はセルライン AKIBA (A*2402, B*5201, Cw*1202, DRB1*1502, DQA1*0103, DQB1*0601, DPB1*0901) から抽出した DNA を添付したものである。このサンプルのタイピングに参加した施設数は、総数 63 施設であり、その内訳を表 2 に示した。最も多くの施設が参加したローカスは DRB1 であり、1 施設を除いて 62 施設がタイピングを行った。また、最も少ないのは DQA1 ローカスであった (3 施設)。また、各ローカスにおける参加施設でタイピング結果を提出するのに最も多く用いた解析レベルは、HLA-B, -C, -DQB1, -DPB1 については high resolution であり、HLA-A, -DRB1 では medium resolution であった。タイピング結果の一致率をみると low resolution レベルでは 100% の一致が得られていたが、high, medium resolution レベルにおいて数箇所のラボで判定結果が異なっている場合があった。例えば、HLA-A*2404, HLA-A*2413/2414, HLA-DRB1*1502 などのミスタイピングと恐らく HLA-B*520101/02 と表記すべきところを HLA-B*5201/12 と表記ミスした施設が数ヶ所で見られた。

2) サンプル 1506R 判定に参加した施設数と判定一致率

サンプル 1506R はセルライン AKIBA (A*2402, B*5201, Cw*1202, DRB1*1502, DQA1*0103, DQB1*0601, DPB1*0901) と TAB (HLA-A*0207, B*4601, Cw*0102, DRB1*0803, DQA1*0103, DQB1*0601, DPB1*0202) から抽出した DNA を等量で混合し、それを濾紙に添付したものである。このサンプルのタイピングに参加した施設数は、総数 64 施設であり、その内訳を表 3 に示した。最も多くの施設が参加したローカスは DRB1 であった。C, DQA1, DQB1, DPB1 ローカスでは結果を提出するのに high resolution を用いたのが参加施設中最も多く、A, B, DRB1, DRB3/4/5 については medium resolution で解析したのが最も多かった。タイピング結果の一致率をみるとサンプル 1505R で見られたように low resolution レベルでは、100% の一致が得られていたが、high, medium resolution レベルにおいて数箇所のラボで判定結果が異なっていた。ミスタイピングとしてコンセンサスは B*5201/4601 のヘテロ接合体であるのに、ホモ接合体様の結果 (B*4601/02, B*52011/012, B*5101/10) を報告したのが見られた。

3) 参加施設が行った検査遺伝子座数

サンプル 1505R, 1506R からタイピングを行った遺伝子座数を集計した結果を表 4, 5 に示した。サンプル 1505R では、A, B, DRB1, DRB3/4/5 の 4 座をタイピングした施設が最も多く (17 施設 / 63: 27%)、次に A, B, DRB1 の 3 座の 11 施設 (17%)、A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQB1 の 6 座の 7 施設 (11%) が続いていた。その他の検査遺伝子座数は施設により異なり、多くても数施設であった。そのなかでも 2 施設は 7 座 (A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQA1, DQB1 と A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQB1, DPB1) をこのサンプルから検査を行っていた。

サンプル 1506R も、サンプル 1505R 同様最も多くの施設がタイピングを行ったのは A, B, DRB1, DRB3/4/5 の 4 座 (28%) であり、2 番目に多かったのも 1505R のときと同様 A, B, DRB1 の 3 座 (17%) であり、続いて A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQB1 の 6 座 (11%) であった。検査遺伝子座数と参加施設

表1 濾紙からのDNA抽出プロトコル(QCWS推奨)

1. DNAを添付した濾紙を2等分にしてチューブに移す。
2. チューブに1000µlの滅菌水を加え、軽くボルテックスし、スピンドウンを行い、洗浄水を除去する。
3. 洗浄を繰り返すか、濾紙をキムワイプで水切りをして新しいチューブに移す。
4. 50µlの滅菌蒸留水をチューブに加え、完全に濾紙を浸らせる。
5. 90℃～95℃で5分加熱
6. ボルテックス(30秒～1分)後、spin-down
7. 新しいチューブにDNA抽出液を移す。

DNA回収率を60%とすると、300ng X 0.6 = 180ngのDNAが得られ、さらに操作上のロスを考慮し、少なくとも150ng/50µl = 3ng/µlのDNAがサンプルから回収される。

表2 参加施設数とHLA型一致率(H1505R)

遺伝子座	参加施設数		コンセンサス		Low		Medium		High	
	N=63	%	遺伝子型	一致率(%)	N(%)	一致率(%)	N(%)	一致率(%)	N(%)	一致率(%)
A	52	83	*2402	6/6 (100)	6/52 (12)	6/6 (100)	40/52 (76)	40/40 (100)	6/52 (12)	4/6 (67)
B	54	86	*5201	4/4 (100)	4/54 (7)	4/4 (100)	20/54 (37)	20/20 (100)	30/54 (56)	30/30 (100)
C	20	32	*1202	2/2 (100)	2/20 (10)	2/2 (100)	4/20 (20)	4/4 (100)	14/20 (70)	14/14 (100)
DRB1	62	98	*1502	5/5 (100)	5/62 (8)	5/5 (100)	29/62 (47)	27/29 (93)	28/62 (45)	27/28 (96)
DRB3/4/5	30	48	5*0102	13/13 (100)	13/30 (43)	13/13 (100)	11/30 (37)	11/11 (100)	6/30 (20)	5/6 (83)
DQA1	3	5	*0103	0	0	0	0		3/3 (100)	100
DQB1	24	38	*0601	1/1 (100)	1/24 (4)	1/1 (100)	5/24 (21)	5/5 (100)	18/24 (75)	18/18 (100)
DPB1	5	8	*0901	0	0	0	0		5/5 (100)	5/5 (100)

表3 参加施設数とHLA型一致率(H1506R)

遺伝子座	参加施設数		コンセンサス		Low		Medium		High	
	N=64	%	遺伝子型	一致率(%)	N(%)	一致率(%)	N(%)	一致率(%)	N(%)	一致率(%)
A	54	84	*0207/2402	9/9 (100)	9/54 (17)	9/9 (100)	44/54 (81)	40/44 (91)	1/54 (2)	1/1 (100)
B	56	88	*4601/5201	5/5 (100)	5/56 (9)	5/5 (100)	33/56 (59)	31/33 (94)	18/56 (32)	16/18 (89)
C	20	31	*0102/1202	3/3 (100)	3/20 (15)	3/3 (100)	7/20 (35)	7/7 (100)	10/20 (50)	10/10 (100)
DRB1	63	98	*0803/1502	7/7 (100)	7/63 (11)	7/7 (100)	34/63 (54)	33/34 (97)	22/63 (35)	22/22 (100)
DRB3/4/5	31	48	5*0102	12/12 (100)	12/31 (39)	12/12 (100)	13/31 (42)	13/13 (100)	6/31 (19)	5/6 (83)
DQA1	3	5	*0103/0103	0	0	0	0		3/3 (100)	100
DQB1	24	38	*0601/0601	1/1 (100)	1/24 (4)	1/1 (100)	4/24 (17)	4/4 (100)	19/24 (79)	19/19 (100)
DPB1	4	6	*0202/0901	0	0	0	0		4/4 (100)	4/4 (100)

表4 H1505R の検査遺伝子座数と参加施設数

遺伝子座数	遺伝子座	施設数	(%)
1	DRB1	4	6
2	A,B	1	2
	B,DRB1	1	2
	DRB1,DQB1	1	2
	DRB1,DRB3/4/5	1	2
3	A,B,DRB1	11	17
	B,DRB1,DQB1	1	2
	C,DRB1,DPB1	1	2
	DRB1,DRB3/4/5,DQB1	1	2
	DRB1,DQB1,DPB1	1	2
4	A,B,C,DRB1	3	5
	A,B,DRB1,DRB3/4/5	17	27
	A,B,DRB1,DQB1	1	2
5	A,B,C,DRB1,DQB1	4	6
	A,B,DRB1,DRB3/4/5,DQB1	2	3
	A,B,DRB1,DQB1,DPB1	1	2
6	A,B,C,DRB1,DRB3/4/5,DQB1	7	11
	A,B,C,DRB1,DQA1,DQB1	2	3
	A,B,C,DRB1,DQB1,DPB1	1	2
7	A,B,C,DRB1,DRB3/4/5,DQA1,DQB1	1	2
	A,B,C,DRB1,DRB3/4/5,DQB1,DPB1	1	2

表5 H1506R の検査遺伝子座数と参加施設数

遺伝子座数	遺伝子座	施設数	(%)
1	DRB1	5	8
2	A,B	1	2
	B,DRB1	1	2
	DRB1,DRB3/4/5	1	2
3	A,B,DRB1	11	17
	B,DRB1,DQB1	1	2
	DRB1,DRB3/4/5,DQB1	1	2
	DRB1,DQB1,DPB1	1	2
4	A,B,C,DRB1	4	6
	A,B,DRB1,DRB3/4/5	18	28
5	A,B,C,DRB1,DQB1	4	6
	A,B,DRB1,DRB3/4/5,DQB1	3	5
	A,B,DRB1,DQB1,DPB1	1	2
6	A,B,C,DRB1,DRB3/4/5,DQB1	7	11
	A,B,C,DRB1,DQA1,DQB1	2	3
	A,B,C,DRB1,DQB1,DPB1	1	2
7	A,B,C,DRB1,DRB3/4/5,DQA1,DQB1	1	2
	A,B,C,DRB1,DRB3/4/5,DQB1,DPB1	1	2

表6 タイピングに用いた方法と使用キット (H1505R)

遺伝子座	方法		キット名	施設数
A		n=52		
	SSO	46	Reli	29
			MPH	11
			SPP	2
			Luminex	2
			LABtype SSO	1
	シオノギ	1		
	SSP	6	Micro-SSP	3
自家製			2	
Pel-SSP			1	
SBT	3	GeneKit	2	
		AlleleSEQR	1	
			ABI	1
RSCA	2	RSCA	2	
RFLP	1	自家製	1	
B		n=54		
	SSO	47	Reli	31
			MPH	11
			SPP	2
			Luminex	2
			LABtype SSO	1
	シオノギ	1		
	SSP	5	Micro-SSP	2
自家製			2	
Pel-SSP			1	
SBT	4	GeneKit	2	
		AlleleSEQR	1	
			ABI	2
RSCA	2	RSCA	2	
RFLP	1	自家製	1	
C		n=22		
	SSO	15	Reli	7
			MPH	7
				LABtype SSO
SSP	5	Micro-SSP	2	
		自家製	2	
		Pel-SSP	1	
SBT	1	GeneKit	1	
		AlleleSEQR	1	
			ABI	1

遺伝子座	方法		キット名	施設数
		n=62		
DRB1	SSO	45	Reli	28
			MPH	13
			SPP	1
			Luminex	2
			Inno-Lipa	1
	SSP	10	Micro-SSP	6
			Dynal-SSP	2
DRLab 自家製			1 1	
SBT	6	GeneKit AlleleSEQR ABI	3 4 1	
RSCA	2	RSCA	1	
RFLP	7	自家製 DRLab	5 2	
SSCP	5	自家製	5	
DRB3/4/5		n=30		
	SSO	23	Reli	23
	SSP	6	Micro-SSP	4
			Dynal-SSP Pel-SSP	1 1
SSCP	2	自家製	2	
DQA1		n=3		
	RFLP	3	自家製	3
	SSCP	1	自家製	1
DQB1		n=24		
	SSO	10	Reli	6
			MPH	4
	SSP	6	Micro-SSP	3
			Dynal-SSP	2
			Pel-SSP	1
SBT	1	AlleleSEQR	1	
RFLP	7	DRLab 自家製	2 5	
		SSCP	2	自家製
DPB1		n=5		
	SSO	1	PHFA	1
	SBT	1	AlleleSEQR	1
	RFLP	3	DRLab 自家製	1 2
			SSCP	1

表7 タイピングに用いた方法と使用キット (H1506R)

遺伝子座	方法		キット名	施設数
A		n=54		
	SSO	44	Reli	29
			MPH	11
			SPP	2
			Luminex	2
			LABtype SSO	1
	シオノギ	1		
	SSP	7	Micro-SSP	3
自家製			2	
Pel-SSP			2	
SBT	4	GeneKit	2	
		AlleleSEQR	2	
		ABI	2	
RSCA	2	RSCA	2	
RFLP	1	自家製	1	
B		n=56		
	SSO	48	Reli	29
			MPH	10
			SPP	2
			Luminex	2
			LABtype SSO	1
	シオノギ	1		
	SSP	6	Micro-SSP	2
自家製			2	
Pel-SSP			2	
SBT	5	GeneKit	2	
		AlleleSEQR	2	
		ABI	3	
RSCA	2	RSCA	2	
RFLP	1	自家製	1	
C		n=20		
	SSO	15	Reli	7
			MPH	7
			LABtype SSO	1
			シオノギ	1
SSP	6	Micro-SSP	2	
		自家製	2	
		Pel-SSP	1	
SBT	1	GeneKit	1	
		AlleleSEQR	1	
		ABI	1	

遺伝子座	方法		キット名	施設数		
		n=63				
DRB1	SSO	44	Reli	28		
			MPH	13		
			SPP	1		
			Luminex	2		
			Inno-Lipa	1		
	SSP	11	Micro-SSP	7		
			Dynal-SSP	2		
SBT	5	DRLab	1			
		自家製	1			
RSCA	2	GeneKit	3			
RFLP	6	AlleleSEQR	3			
		ABI	2			
SSCP	4	RSCA	1			
DRB3/4/5	SSO	23	自家製	5		
			DRLab	1		
	SSP	7	自家製	4		
			DRLab	1		
	SSCP	1	自家製	4		
DQA1	RFLP	3	自家製	3		
			SSCP	1	自家製	1
DQB1	SSO	10	Reli	6		
			MPH	4		
	SSP	7	Micro-SSP	4		
			Dynal-SSP	2		
			Pel-SSP	1		
	SBT	1	AlleleSEQR	1		
	RFLP	7	DRLab	2		
自家製			5			
SSCP	2	自家製	2			
DPB1	SBT	1	AlleleSEQR	1		
	RFLP	3	DRLab	1		
			自家製	2		
SSCP	1	自家製	1			

表 8 型判定に使用した方法数 (H1505R)

遺伝子座		1種類	2種類	8	4種類		
A	43	1種類	SSP+RSCA	1	3種のSBT+SSP		
			Reli+SSP	1			
			RFLP+SSP	1			
			SSP+SPP	1			
			MPH+RFLP	1			
			Reli+Luminex	1			
B	46	1種類	2種類	6	3種類		
			Reli+SSP	2	Gene+Allele+ABI		
			Reli+Luminex	1	MPH+RFLP+SBT		
			RFLP+SSP	1			
C	19	1種類	2種類	2	4種類		
			MPH+SSP	1	3種のSBT+SSP		
			Reli+SSP	1			
遺伝子座		1種類	2種類	8	3種類	4	4種類
DRB1	49	1種類	Reli+SSP	2	MPH+SSP+SSCP	1	3種のSBT+RFLP
			Reli+RFLP	1	SBT+RFLP+SSCP	2	
			Reli+Luminex	1	Reli+RFLP+SSCP	1	
			MPH+SSCP	3			
DRB3/4/5	30	1種類	SSP+SPP	1			
DQA1	3	1種類					
DQB1	21	1種類	2種類	2	3種類	1	
			Reli+SSP	1	Reli+RFLP+SSCP	1	
DPB1	4	1種類	RFLP+SSCP	1			
			2種類	1			
			RFLP+SSCP	1			

表9 型判定に使用した方法数 (H1506R)

遺伝子座	1種類	2種類	8	4種類
A	45	Reli+SSP	2	3種のSBT+SSP
		RFLP+SSP	1	
		SSP+SPP	1	
		MPH+RFLP	1	
		MPH+SSCP	1	
B	47	Reli+Luminex	1	Gene+Allele+ABI MPH+RFLP+SBT
		RFLP+SSP	1	
		LABtype+SSP	1	
		SSP+SPP	1	
		Reli+RSCA	1	
C	18	Reli+RSCA	1	3種類
		MPH+SSCP	2	
		SBT+SSP	1	

遺伝子座	1種類	2種類	10	3種類	2	4種類
DRB1	50	Reli+SSP	3	MPH+SSP+SSCP SBT+RFLP+SSCP	1	3種のSBT+RFLP
		Reli+RFLP	1			
		Reli+Luminex	1			
		MPH+SSCP	5			
DRB3/4/5	30					
DQA1	3					
DQB1	20	2種類	4			
		Reli+SSP	1			
		MPH+SSCP	1			
		Reli+SSCP	1			
DPB1	4	RFLP+SSCP	1			
		2種類 RFLP+SSCP	1			

設数の関連は両サンプルで同じ傾向を示した。

4. タイピングに用いた検査法の内訳

今回のテーマについて各施設は様々な検査法を用いて結果を出しているのが、表6,7から明らかである。表は各ローカスの遺伝子型判定に使用した方法(キット)とその方法を用いた施設数との関係を示した。いずれのローカスにおいても大多数の施設ではSSO法に準じたタイピングキットで検査している。これらの結果は、両サンプルで共通していた。

サンプルの型判定に使用した方法数と各ローカスについて集計すると、いずれのサンプルについても一種類の方法による検査が大多数を占めていた。サンプル1505Rは2種類の方法を用いて判定しているところがAローカスでは8施設、Bローカスでは6施設、DRB1ローカスでは8施設、DQB1ローカスでは2施設もあり、同じくサンプル1506RについてはAローカスでは8施設、Bローカスでは7施設、DRB1ローカスでは10施設、DQB1ローカスでは4施設であった(表8,9)。また、両サンプルにおいて3~4種類の方法を用いてタイピングを行った施設があった。

5. 考察

今回の課題は、今後HLAタイピングにおいて遭遇すると思われる全血以外の微量なDNAサンプルについて、HLA-DNAタイピングの可能性について検討した。今回は300ng程のDNAを濾紙に添付し、各施設でその濾紙からDNAを抽出し、それぞれの方法によりタイピングを行った。タイピング法は、試料が微量であることから最も感度に優れているSSO法を用いたキットを使用する施設が多かったのは、妥当な選択だと考えられる。ところが、通常A, B, Cw, DRB1, DQB1をタイピングするのに500ng以上は必要といわれているSSP法を用いて6ローカスもタイピングできているのには興味を持たされた。さらに、限られたDNAで7ローカスのタイピングをしていることにも感心させられた。今回の試みでは、1505R, 1506R両サンプルでいずれも非常に高い一致率(97%)を示し、タイピングの精度が高いことが証明され、今後全血以外の微量DNAサンプルでも正確なタイピングが可能であることが示唆された。

第7回 HLA-QC ワークショップレポート—LOH—

安波道郎^{1,2)}, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林 賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾,
中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 木村彰方^{1,2)}
(日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会)

- 1) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部ゲノム多様性研究室, 2) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, 3) 信州大学医学部法医学, 4) 東京都赤十字血液センター検査部, 5) 防衛医科大学校検査部,
6) 国立佐倉病院 HLA 検査室, 7) 国立循環器病センター研究所, 8) 神奈川県赤十字血液センター検査部,
9) 東海大学医学部分子生命科学系, 10) 特定非営利活動法人 HLA 研究所

1. LOH

白血病などの血液疾患患者の末梢血や固形腫瘍組織を試料とするタイピングにおいて、いわゆる「ヘテロ接合性の消失 loss of heterozygosity (LOH)」と

いう現象のために、データの解釈、型判定に苦労することがある。今回のQCワークショップではH1503とH1504の試料はLOHを模したものとして配布された。

2. LOH について

腫瘍の発症、進展過程で体細胞突然変異により遺伝子 DNA に多段階的に変化が蓄積して、腫瘍細胞のなかでもより増殖、浸潤能の高いものが生き残ってくるのが知られている。その際の体細胞突然変異には、染色体の異数性や部分欠失も含まれ、欠失が起これば正常細胞では 1 対 1 の比で存在する父性対立遺伝子と母性対立遺伝子の一方を欠くため、その遺伝子座位においてヘテロ接合性が消失して見える。

3. H1503 と H1504 の試料について

LOH を模したものを、HLA 遺伝子座についてのホモ接合体細胞株由来の DNA が用いて作成した。

1) H1503-AKIBA と TAB の DNA を 1:1 の比で混和し、ヘテロ接合体の正常細胞を模したもの

2) H1504-AKIBA と TAB の DNA を 9:1 の比で混和し、同じ人で LOH を生じた組織を模したもの

これらの 2 つの試料について、種々のタイピング方法でのデータを比較した。

4. タイピングデータ

個々のタイピング方法、キットでの結果は方法論別解析の項で詳細に論じられているので、ここでは省略し、LOH 試料における問題点について考察した。一般に腫瘍組織自体均質なものはまれであり、均質なものであっても、採取した組織の一部には正常細胞が混在するので、試料には LOH として欠失した対立遺伝子の配列を幾分かは含んでいることが多い。そのために生じる問題点の主なものは、(1) 方法論により異なる結果が出ること、(2) 欠失した対立遺伝子のシグナルが部分的に混在するためにタイプ不能となること、の 2 点であると考えられた。

現在の HLA DNA タイピング法は例外なく PCR 法による DNA 増幅を行なっているが、その増幅がジェネリックな増幅であるか、アレルまたはアレルグループ特異的な増幅であるかによって、少量混在する配列について大きく異なる結果となる。概して SSOP 法 (SSO 法)、SBT 法など多型検出に先立って座位特異的なジェネリックな PCR をする場合、プライマー=テンプレートの適合性に相違がなければ、

増幅前に混在する配列は、アレル相互の間で共通なプライマーを取り合う競合的 PCR となり、もとの混在比のまま増幅される。ただし、一部のキットでは(プライマーの配列情報は公開されていないが)座位特異的な増幅にいくつかのグループ特異的なプライマーの混合物を用いている。混在する配列が異なるプライマーに適合していれば共通なプライマーに対する競合はなく、多重 PCR に似た状況となるため、それぞれのプライマーの増幅効率にしたがって、基質や酵素を消耗するまで増幅し続け増幅前後でその混在比が変わってしまう。そのため欠失している対立遺伝子の配列が、元の量比より過大に含まれる結果となる。

これに対して、SSP 法ではそれぞれのプライマーの増幅効率にしたがって、増幅するので試料中に含まれる配列の絶対量がそれぞれの反応の検出限界を超える程度であるかによって結果が左右される。一般には LOH の有無に関わらずヘテロ接合体は 2 アレル検出されることが多い。しかし、SSP のプライマーは非特異的な配列を増幅しないよう設計するため、必ずしも微量の試料からの増幅について最適化されていない場合があり、そのような場合には、LOH の

表 1 SSOP (Wakunaga MPH-2 A-locus Lot COA)

	well	k	l	m	n	o	p
Lab x	H1503R	248	9	187	12	139	277
	H1504R	301	8	63	13	251	138
Lab y	H1503	138	11	38	10	54	163
	H1504	142	9	14	8	58	37
Lab z	H1503R	230	9	175	14	190	231
	H1504R	237	13	66	17	216	118
		positive	negative	LOH	negative	positive	LOH

欠失したアレルに対応するウェルで弱い反応を認めた。

表 2 SSP (microSSP ABDR Lot#04A)

	position	9D	9C	9B	9A	10H
Lab x	H1503R	1	8	1	8	8
	H1504R	1	8	1	8	8
Lab y	H1503R	1	8	1	8	8
	H1504R	1	8	1	8	8
Lab z	H1503R	1	6	1	8	6
	H1504R	1	6	1	8	6
		negative	LOH	negative	positive	LOH

このキットでは欠失したアレルに対応するウェルでも陽性反応を認めた。

ために型判定が困難となる可能性があり、使用するキットの各々の反応ごとの特性を把握しておく必要がある。

以下に実例をあげてみる。

A-locus と B-locus で結果が異なっていた。A-locus では欠失したアレルの信号はほとんどノイズに隠れるほどであったが、B-locus では(おそらく2つのアレルが異なるグループに属するため)欠失したアレルも、ある程度増幅されていた。(図1)

クラス I の RSCA では座位特異的なジェネリックな PCR の前後で DNA の量比は保たれると考えられ、ピーク高またはピークの下面積を計測して

LOH を評価できるという点で非常に有用と考えられた。(図2)

5. TAB の HLA-A 座位について

いくつかのラボから、H1503 で 3 アレル (A*0201, A*0207, A*2402) 検出されたとの報告があり、試料調製に用いた細胞株 TAB が A*0201, A*0207 のヘテロ接合である可能性が疑われた。この TAB の DNA について SBT を施行したところ、A*0201, A*0207 のヘテロ接合とタイプされた。(図3)

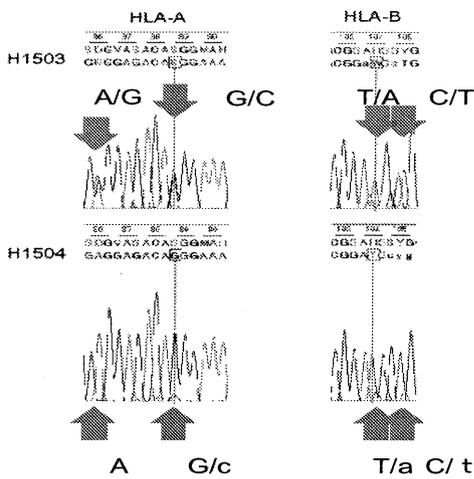


図1 SBT (ABI)

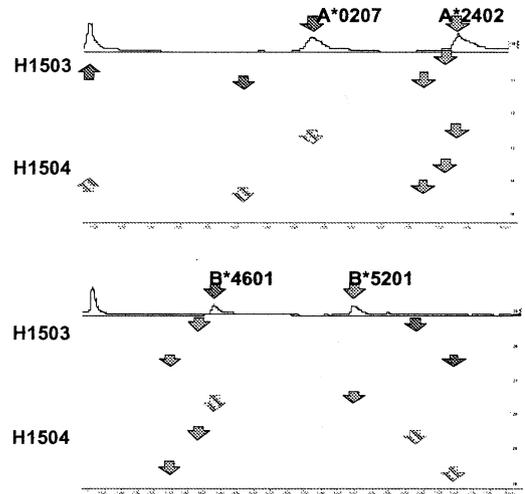


図2 -RSCA

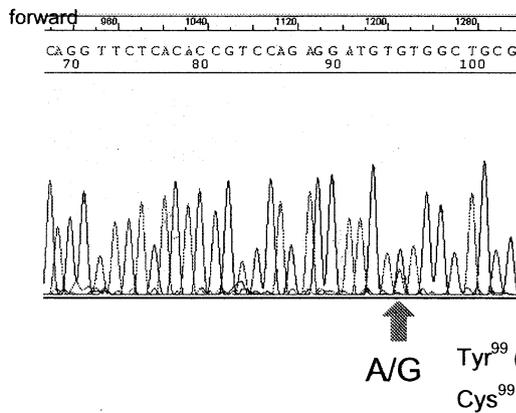


図3 A-locus exon 3

第7回 HLA-QC ワークショップレポート —DNA タイピング結果表記と血清対応型表記—

田中秀則¹⁾, 太田正穂²⁾, 柏瀬貢一¹⁾, 小林 賢³⁾, 酒巻建夫⁴⁾, 佐田正晴⁵⁾,
中島文明⁶⁾, 成瀬妙子⁷⁾, 丸屋悦子⁸⁾, 安波道郎^{9,10)}, 木村彰方^{9,10)}
(日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会)

1) 東京都赤十字血液センター検査部, 2) 信州大学医学部法医学, 3) 防衛医科大学校検査部, 4) 国立佐倉病院 HLA 検査室, 5) 国立循環器病センター研究所, 6) 神奈川県赤十字血液センター検査部, 7) 東海大学医学部分子生命科学系, 8) 特定非営利活動法人 HLA 研究所, 9) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, 10) 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部ゲノム多様性研究室

1. はじめに

これまで、日本組織適合性学会では標準化委員会を中心に、アレル表記法または血清対応型の表記法について、その指針を示してきており、アレル表記法は「アレル表記法と結果報告の原則について2000」において、また血清対応型の表記については「アレル表記法と結果報告の原則について2002」において主に示されている。QC ワークショップにおける結果報告も、これらの原則に従って結果の表記をするようになっており、今回のHLA-QC ワークショップにおける各施設からの結果報告を基に、結果表記の問題点について検討を行なったので報告する。

2. 結果および考察

各参加施設から提出された結果を、ローカスごとに集計し、原則とは異なる表記および今後検討を要する表記については表中に網掛けで示した(表1~8)。

結果表記に関する原則では、区分できないアレル(アンビギュイティ)の取り扱いとして、最初のアレル(番号の若いもの)を4桁表記し、その後「/」を入れ、2つ目以降のアレルは3桁目4桁目の2数字のみを記載する(4桁/2桁表記法)としている。

今回の結果報告で、2桁の結果表記が多く見られたが、2桁レベル(粗分別, low-resolution)のタイピングキットを使用したことから、2桁の結果表記となったと推察されるが、2桁でのタイピング結果は、

区分出来ないアレルが存在しているということであり、基本的には原則に基づいた「4桁/2桁」結果表記が望ましいと思われる。中でも、B*150101をB*15と表記された結果が意外と多く見られ、複数存在するB15アレルの何れと関連しているのか、特定できない表記であり、HLA抗原型も当然分からない表記である。しかし、HLA抗原型はB62と結果報告されており、B62を特定できるタイピング結果であるなら、結果表記もそれが分かるような表記が必要だと思われる。

DNAタイピング結果として不適切な表記として、タイピング結果を、HLA抗原型に置き換えて報告された例(クラスI: A*2, B*62, Cw*09, クラスII: DRB5*51, DRB3*52, DRB4*53)が見られた。2桁レベルのタイピングキットを使用した結果だと思われるが、この点については先に述べたように「4桁/2桁」表記法が必要だと思われる。また、HLA-DRB3, 4, 5, での結果で、単にローカス名(DRB3, DRB4およびDRB5)を表記した結果もあった。また、「()」を付けた表記や、「?」を付けた表記が見られ、これらもDNAタイピング結果としては不適切である。

「,」を使った表記法については、原則において1つのカラム(セル)に2つのアレルを記載する場合に使用する表記法であり、今回のように各ローカスに2つの結果入力カラムがある場合には、使用するべき表記法ではない。また、報告結果で「,」を使った

表1 HLA-A ローカス表記の集計

Sample :H1501R				
Allele:A*021701		Allele:A*2601		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 02	9	1 26	9	
2 0201	1	2 2601	17	
3 0201/02/03/+	7	3 2601/+	1	
4 0201/04/17	1	4 2601/02	5	
5 0201/07/09/+	1	5 2601/02/+	1	
6 0201/07/0217/+	1	6 2601/02/03/+	6	
7 0204/17	18	7 2601/02/04/+	16	
8 0214/17	2	8 2601/02/10/+	7	
9 0217	24	9 2601/10/11N/+	3	
10 0217/33	1	10 2601/10/13/+	1	
11 021701	2	11 2601/10/14	1	
12 N.T.	6	12 N.T.	6	

Sample :H1502R				
Allele:A*2501		Allele:A*3201		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 25	8	1 32	10	
2 25.66	1	2 32/74	1	
3 25/26	1	3 3201	23	
4 2501	34	4 3201/02/03/+	1	
5 2501/+	1	5 3201/05/06/+	1	
6 2501/02	2	6 3201/02/03	1	
7 2501/02/+	1	7 3201/02/03/+	6	
8 2501/02/03	1	8 3201/05	15	
9 2501/02/03/+	4	9 3201/05/06	4	
10 2501/02/07/+	1	10 3201/05/7405	1	
11 2501/03	1	11 3201/06	2	
12 2501/2/3	1	12 3201/7405/+	1	
13 2501/2605	6	13 3203	1	
14 2605	5	14 N.T.	6	
15 N.T.	6			

Sample :H1503R				
Allele:A*0207		Allele:A*240201		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 02	1	1 未記入	1	
2 0201	2	2 24	13	
3 0201,0207,2402	1	3 2402	5	
4 0201/02/03/+	7	4 2402/03+	1	
5 0201/02/04/+	2	5 2402/03/+	1	
6 0201/0207	1	6 2402/03/04/+	8	
7 0201/04+	1	7 2402/03/05/+	8	
8 0201/04/+	1	8 2402/03/07/+	1	
9 0201/04/06/+	2	9 2402/03/08/+	1	
10 0201/04/07/+	10	10 2402/03/09/+	2	
11 0201/07	2	11 2402/03/13/+	1	
12 0201/07/+	3	12 2402/04/07	2	
13 0201/07/09/+	7	13 2402/07/09N/+	4	
14 0201/07/15/+	2	14 2402/09/+	1	
15 0201/07/15N/+	3	15 2402/09/11/+	2	
16 0201/07/18/+	1	16 2402/09N	1	
17 0201/09/12	1	17 2402/09N/+	1	
18 0201/12/36	1	18 2402/09N/11N	1	
19 0207	6	19 2402/09N/11N/+	2	
20 0207/15N	3	20 2402/14/15/+	1	
21 N.T.	6	21 2402/17	1	
		22 2402/17/20/+	1	
		23 2402/20	3	
		24 2402/20/+	1	
		25 2402/20/21/+	1	
		26 240201	1	
		27 24021	2	
		28 N.T.	6	

Sample :H1504R				
Allele:A*0207		Allele:A*240201		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入	2	1 未記入	1	
2 0201/07) 1	1	2 24	13	
3 -	2	3 2402	6	
4 02	11	4 2402/03/+	2	
5 0201,0207,2402	1	5 2402/03/04/+	8	
6 0201/02/+	2	6 2402/03/05/+	9	
7 0201/02/03/+	7	7 2402/03/07/+	1	
8 0201/02/04/+	2	8 2402/03/08/+	1	
9 0201/03/04/+	1	9 2402/04/07	2	
10 0201/03/06/+	1	10 2402/04/07/+	2	
11 0201/04/+	1	11 2402/07/09N/+	4	
12 0201/04/06/+	2	12 2402/09/+	1	
13 0201/04/07/+	10	13 2402/09/11/+	1	
14 0201/07	1	14 2402/09N	1	
15 0201/07/+	3	15 2402/09N/+	1	
16 0201/07/09/+	7	16 2402/09N/11N	1	
17 0201/07/15/+	1	17 2402/09N/11N/+	2	
18 0201/07/15N/+	3	18 2402/14/15/+	1	
19 0201/07/18/+	1	19 2402/17	1	
20 0207	4	20 2402/17/20/+	1	
21 0207/15N	3	21 2402/20	3	
22 N.D.	1	22 2402/20/+	1	
23 N.T.	6	23 2402/20/21/+	1	
		24 240201	1	
		25 24021	1	
		26 N.D.	1	
		27 N.T.	6	

Sample :H1505R				
Allele:A*240201		Allele:A*240201		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入	6	1 未記入	15	
2 24	6	2 -	36	
3 2402	5	3 +/-	1	
4 2402/03/+	1	4 24	1	
5 2402/03/04/+	1	5 2402	1	
6 2402/03/05/+	12	6 2402/05+	1	
7 2402/05/07+	1	7 2402/05/09N/+	1	
8 2402/07/09N/+	4	8 2402/07	1	
9 2402/07/09N/+	1	9 2414	1	
10 2402/09/+	1	10 N.D.	9	
11 2402/09/11/+	3	11 N.T.	6	
12 2402/09/15	1			
13 2402/09N+	1			
14 2402/09N/+	1			
15 2402/09N/11N	1			
16 2402/09N/11N/+	4			
17 2402/17	1			
18 2402/17/20/+	1			
19 2402/20	3			
20 2402/20/+	1			
21 2402/3/05/+	1			
22 2404	1			
23 2413	1			
24 N.D.	9			
25 N.T.	6			

Sample :H1506R				
Allele:A*0207		Allele:A*240201		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入	5	1 未記入	6	
2 02	7	2 24	9	
3 0201	1	3 2402	2	
4 0201,0207,2402	1	4 2402/03+	1	
5 0201/02/03/+	2	5 2402/03/+	1	
6 0201/02/04/+	1	6 2402/03/04/+	1	
7 0201/04+	1	7 2402/03/04/+	2	
8 0201/04/+	1	8 2402/03/05/+	9	
9 0201/04/06/+	1	9 2402/03/08/+	1	
10 0201/04/07/+	12	10 2402/03/09/+	1	
11 0201/07	2	11 2402/04/07	1	
12 0201/07/+	3	12 2402/05/07+	1	
13 0201/07/09/+	7	13 2402/07/09/+	1	
14 0201/07/15/+	1	14 2402/07/09N/+	3	
15 0201/07/15N/+	3	15 2402/09/+	1	
16 0201/07/18/+	1	16 2402/09/11/+	4	
17 0201/09/12	1	17 2402/09/15	1	
18 0207	3	18 2402/09N	1	
19 0207/15	1	19 2402/09N/+	1	
20 0207/15N	3	20 2402/09N/11N	1	
21 2	1	21 2402/09N/11N/+	3	
22 N.D.	8	22 2402/14/15/+	1	
23 N.T.	7	23 2402/17	1	
		24 2402/17/20/+	1	
		25 2402/20	3	
		26 2402/20/+	1	
		27 N.D.	8	
		28 N.T.	7	

表2 HLA-B ローカス表記の集計

Sample :H1501R					
Allele:B*0801			Allele:B*150101		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	01/08N	1	1	-	1
2	08	14	2	15	9
3	0801	16	3	1501	11
4	0801/02/+	1	4	1501/+	1
5	0801/04	2	5	1501/04/07/+	2
6	0801/04/05	1	6	1501/04/12/+	4
7	0801/04/05/+	4	7	1501/05/07/+	1
8	0801/04/08/+	8	8	1501/07/+	1
9	0801/04/08N/+	2	9	1501/07/12/+	10
10	0801/04/08N/15	1	10	1501/07/26/+	4
11	0801/04/10/+	3	11	1501/12/+	2
12	0801/05/07/+	2	12	1501/12/14/+	3
13	0801/05/08N/+	1	13	1501/12/19/+	6
14	0801/08	2	14	1501/20/25/+	1
15	0801/08N	2	15	1501/26N	1
16	0801/08N/10	1	16	1501/26N/27	1
17	0801/08N/13/+	1	17	1501/26N/28/+	1
18	0801/08N/15	3	18	1501/33/34	1
19	0801/10/11/+	1	19	1501/56	1
20	0807	1	20	1501/75	1
21	1501/07/26/+	1	21	150101	2
22	N.T.	5	22	15011	1
			23	1507/32/35/+	1
			24	1554	1
			25	62	1
			26	N.T.	5

Sample :H1502R					
Allele:B*440201?			Allele:B*510101		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	44	13	1	51	12
2	4402	12	2	5101	9
3	4402/03	1	3	5101/02	3
4	4402/03/+	1	4	5101/02/03/+	4
5	4402/03/05/+	3	5	5101/03	2
6	4402/03/06/+	1	6	5101/03/+	1
7	4402/03/07	2	7	5101/03/04	1
8	4402/03/07/+	16	8	5101/03/04/+	7
9	4402/03/11/+	1	9	5101/03/07/+	7
10	4402/05	2	10	5101/03/08/+	3
11	4402/05/11/+	2	11	5101/03/09	2
12	4402/19	1	12	5101/03/09/+	4
13	4402/19/23/+	1	13	5101/03/11/+	1
14	4402/19N	4	14	5101/03/11N/+	3
15	4402/19N/+	1	15	5101/11N/+	1
16	4402/19N/23N/+	2	16	5101/11N/18/+	1
17	4402/105/11/+	2	17	510101	5
18	44022	1	18	51011	2
19	4403/13/26	2	19	N.T.	5
20	N.T.	5			

Sample :H1503R					
Allele:B*4601			Allele:B*520101		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	46	6	1	52	7
2	4601	24	2	5201	38
3	4601/02	38	3	5201/02/03	1
4	N.T.	5	4	5201/04/05	2
			5	5201/12	3
			6	5201/2/3	1
			7	520101	6
			8	52011	4
			9	52011/012	4
			10	52011/12	2
			11	N.T.	5

Sample :H1504R					
Allele:B*4601			Allele:B*520101		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	(4601)	1	1	52	8
2	(4601) 1	1	2	5201	36
3	-	5	3	5201/02/03	1
4	46	5	4	5201/04/05	2
5	4601	16	5	5201/12	3
6	4601/02	31	6	5201/2/3	1
7	4602	6	7	520101	5
8	4602?	1	8	52011	4
9	N.D.	2	9	52011/012	4
10	N.T.	5	10	52011/12	2
			11	N.D.	2
			12	N.T.	5

Sample :H1505R					
Allele:B*520101			Allele:B*520101		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	未記入	5	1	未記入	16
2	52	5	2	-	36
3	5201	21	3	-/+	1
4	5201/+	1	4	5201	1
5	5201/03	10	5	5201/03	2
6	5201/03/04/+	1	6	5201/03/-	1
7	5201/05	1	7	5201/04+	1
8	5201/12	3	8	520101	1
9	520101	4	9	N.D.	7
10	52011	3	10	N.T.	7
11	52011/012	3			
12	52011/12	2			
13	N.D.	7			
14	N.T.	7			

Sample :H1506R					
Allele:B*4601			Allele:B*520101		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	未記入	3	1	未記入	3
2	-	2	2	-	1
3	46	4	3	5101/10	1
4	4601	19	4	5107	1
5	4601/02	31	5	52	5
6	N.D.	7	6	5201	30
7	N.T.	7	7	5201/02/03	1
			8	5201/04/05	1
			9	5201/05	1
			10	5201/12	3
			11	520101	4
			12	52011	3
			13	52011/012	3
			14	52011/12	2
			15	N.D.	7
			16	N.T.	7

結果表記があったが、2種類の異なる HLA 抗原型に対応するアリの表記に使用されており、この点も原則に沿わない表記であった。また「/+」を使った表記法は、2桁レベルでも区分できないアリ(ア

ンビギュイティ)の場合に使用される表記法であり、一部の結果報告に用いられていた。しかし、現実的には抗原型を確定出来ない結果になる場合も多いことから、別のタイピングキットを用いた検査を追加

表 3 HLA-C ローカス表記の集計

Sample :H1501R				
Allele:Cw*030301		Allele:Cw*0701		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入	32	1 未記入	32	
2 03	7	2 07	9	
3 0301/03	1	3 07/02/03/+	1	
4 0301/11	1	4 0701	3	
5 0302/03/04/+	1	5 0701/02/+	2	
6 0303	10	6 0701/02/03/+	12	
7 0303/11	3	7 0701/04/+	1	
8 0303/11/+	1	8 0701/05/06	4	
9 0303/11/12	2	9 0701/05/06/+	2	
10 0303/11/12/+	4	10 0701/06	4	
11 0303/11/13	3	11 0701/06/16/+	1	
12 0303/13	2			
13 030301	2			
14 03031	1			
15 09	1			

Sample :H1502R				
Allele:Cw*0102		Allele:Cw*0501		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入	32	1 未記入	32	
2 01	7	2 -	1	
3 0102	12	3 05	7	
4 0102/03	7	4 0501	3	
5 0102/03/+	1	5 0501/02	3	
6 0102/03/05	1	6 0501/02/+	2	
7 0102/03/05/+	3	7 0501/02/03	4	
8 0102/03/07/+	1	8 0501/02/03/+	6	
9 0102/05	1	9 0501/03	5	
10 0102/05/06	6	10 0501/03/05	7	
		11 0501/03/05/+	1	

Sample :H1503R				
Allele:Cw*0102		Allele:Cw*120202		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入	33	1 未記入	33	
2 01	7	2 -	1	
3 0102	13	3 12	4	
4 0102/03	6	4 12/13	3	
5 0102/03/+	1	5 1202	21	
6 0102/03/04/+	1	6 1202/+	1	
7 0102/03/05/+	1	7 1202/03/+	1	
8 0102/03/06	1	8 1202/03/04/+	3	
9 0102/05	1	9 1202/032/08	2	
10 0102/05/06	6	10 1202/08	2	
11 0102/07	1			

Sample :H1504R				
Allele:Cw*0102		Allele:Cw*120202		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入	34	1 未記入	32	
2 01	7	2 -	2	
3 0102	6	3 12	2	
4 0102/03	9	4 12/13	4	
5 0102/03/+	2	5 1202	1	
6 0102/03/04/+	2	6 1202/+	20	
7 0102/03/05/+	1	7 1202/03/+	1	
8 0102/03/06	2	8 1202/03/04/+	2	
9 0102/05/06	4	9 1202/03/04/06	3	
10 0104	1	10 1202/032/08	1	
11 1404	1	11 1202/08	2	
12 N.D.	1	12 N.D.	2	

Sample :H1505R				
Allele:Cw*120202		Allele: -		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入	44	1 未記入	50	
2 12	2	2 -	11	
3 1202	14	3 1202	3	
4 1202/+	2	4 N.D.	5	
5 1202/032/08	2	5 N.T.	2	
6 N.D.	5			
7 N.T.	2			

Sample :H1506R				
Allele:Cw*0102		Allele:Cw*120202		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入	42	1 未記入	42	
2 01	3	2 12	2	
3 0102	10	3 1202	14	
4 0102/03	2	4 1202/+	2	
5 0102/03/05	1	5 1202/032/08	1	
6 0102/05/06	3	6 1202/08	1	
7 0102/07	1	7 N.D.	6	
8 N.D.	6	8 N.T.	3	
9 N.T.	3			

して行うべきだと考える。

結果表記に関する原則の4種類以上の区別出来ない4桁アレルが存在する場合は、「番号の若い順に3アレルを4桁/2桁表記し、最後に「/+」をつける(例: DRB1 ローカスの「0401/03/04/+」)」となっている。しかし、今回の結果表記において、番号の若い順に2アレルが表記された結果(例: 0401/03/+)が多く見られ、今後の周知徹底が必要と思われた。

また、区分できないアレル(アンビギュイティ)の取り扱いでは、「4桁/2桁表記を基本とするため、5桁表記が混在する表記はしない」とされており、B*520101 での表記で B*52011/012 または B*520101/0102 と表記した例が多く見られ、このような例では B*5201 と表記する方が原則に沿っている。また、6桁目にあたる「N」が記載された結果(例: A*2402/09N/11N/+, A*0201/07/15N/+ 等)も

表 4 HLA-DRB1 ローカス表記の集計

Sample :H1501R				
Allele:DRB1*1402		Allele:DRB1*150101		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1	14	1	15	8
2	1401/02/05/+	2	1501	22
3	1402	3	1501/02	1
4	1402/+	4	1501/02/+	2
5	1402/06/09/+	5	1501/02/03/+	11
6	1402/03/05/+	6	1501/02/04/+	13
7	1402/03/06/+	7	1501/02/05/+	1
8	1402/05/06/+	8	1501/03/07	1
9	1402/06	9	1501/06	1
10	1402/06/+	10	1501/06/07/+	4
11	1402/06/09/+	11	1501/09/+	1
12	1402/06/13/+	12	1501/12/13	1
13	1402/13	13	150101	4
14	1409/17/30/+	14	15011	2
15	1429	15	N.T.	1
16	1441			
17	N.T.			

Sample :H1502R				
Allele:DRB1*0404		Allele:DRB1*130201		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1	04	1	13	9
2	0401/02/03/+	2	13/14	1
3	0402/04/08/+	3	1301/+	1
4	0404	4	1301/02	1
5	0404/05/08/+	5	1301/02/03/+	7
6	0404/08	6	1301/02/05/+	1
7	0404/08/+	7	1301/02/08/+	3
8	0404/08/19/+	8	1301/02/15/+	6
9	0404/23	9	1301/02/16/+	2
10	0404/23/32	10	1301/1402/+	2
11	0404/23/32/+	11	1302	28
12	0404/42	12	1302/+	1
13	0405/10/+	13	1302/08	1
14	N.T.	14	1302/16/+	1
		15	1302/31/36/+	3
		16	130201	3
		17	13021	2
		18	N.T.	1

Sample :H1503R				
Allele:DRB1*080302		Allele:DRB1*150201		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1	08	1	15	8
2	0801/02/03/+	2	1501	1
3	0801/02/032/+	3	1501/02	2
4	0801/03/05/+	4	1501/02/+	1
5	0801/03/06	5	1501/02/03/+	10
6	0802/03	6	1501/02/04/+	12
7	0802/03/04/+	7	1502	23
8	0803	8	1502/04/+	1
9	0803/+	9	1502/08	2
10	0803/05/06/+	10	1502/11	3
11	0803/10	11	150201	5
12	0803/10/+	12	15021	3
13	0803/10/14/+	13	1302	1
14	0803/10/23	14	N.T.	1
15	0803/10/23/+			
16	0803/14			
17	0803/14/18/+			
18	0803/23			
19	080302			
20	08032			
21	N.T.			

Sample :H1504R				
Allele:DRB1*080302		Allele:DRB1*150201		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1	(0803/10/23)	1	15	8
2	-	2	1501	1
3	08	3	1501/02	2
4	0801/02/03/+	4	1501/02/+	1
5	0801/02/032/+	5	1501/02/03/+	10
6	0801/03/05/+	6	1501/02/04/+	11
7	0802/03	7	1502	24
8	0802/03/04/+	8	1502/04/+	1
9	0803	9	1502/08	2
10	0803/+	10	1502/11	3
11	0803/01	11	150201	5
12	0803/04/05/+	12	15021	3
13	0803/05/06/+	13	N.D.	1
14	0803/06/07/+	14	N.T.	1
15	0803/10			
16	0803/10/+			
17	0803/10/14/+			
18	0803/10/23/+			
19	0803/14			
20	0803/14/18/+			
21	0803/23			
22	080302			
23	08032			
24	?			
25	N.D.			
26	N.T.			

Sample :H1505R				
Allele:DRB1*150201		Allele:DRB1*150201		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1	15	1	未記入	16
2	1501	2	-	40
3	1501/02	3	15	1
4	1501/02/+	4	1501/02/03/+	1
5	1501/02/03/+	5	1501/11/-	1
6	1501/02/04	6	1502	1
7	1501/02/04/+	7	150201	1
8	1502	8	1601/03	1
9	1502/04/+	9	N.D.	4
10	1502/08	10	N.T.	7
11	1502/11			
12	150201			
13	15021			
14	N.D.			
15	N.T.			

Sample :H1506R				
Allele:DRB1*080302		Allele:DRB1*150201		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1	08	1	-	1
2	080/10/14/+	2	15	6
3	0801/02/03/+	3	1501/02	2
4	0801/02/032/+	4	1501/02/+	1
5	0801/03/06	5	1501/02/03/+	8
6	0802/03	6	1501/02/04/+	15
7	0803	7	1502	18
8	0803/10	8	1502/04/+	1
9	0803/10/+	9	1502/08	1
10	0803/10/14/+	10	1502/11	1
11	0803/10/23	11	150201	6
12	0803/10/23/+	12	15021	3
13	0803/14	13	N.D.	4
14	0803/14/18/+	14	N.T.	6
15	0803/23			
16	080302			
17	08032			
18	N.D.			
19	N.T.			

表 5 HLA-DRB3, 4, 5 ローカス表記の集計

Sample :H1501R			
Allele:DRB3*0101		Allele:DRB5*0101	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入	33	1 未記入	30
2 01	3	2 01	5
3 01/02/03	7	3 01/02	7
4 0101	8	4 01/02/03/+	1
5 0101/02/+	1	5 0101	5
6 0101/02/03/+	2	6 0101/02/+	1
7 0101/0202/+	1	7 0101/02/03/+	3
8 0101/03/+	2	8 0101/04	1
9 0101/03/04/+	5	9 0101/05/09	14
10 0101/03/05	1	10 0101/05/09/+	1
11 0101/04	4	11 51	1
12 0103	1	12 DRB5	3
13 02	2		
14 52	1		
15 DRB3	1		

Sample :H1502R			
Allele:DRB3*0301		Allele:DRB4*010101	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入	32	1 未記入	30
2 01/02/03	9	2 01	9
3 01/02/03/+	1	3 01/02	4
4 0101/02/+	1	4 01/02/03	1
5 0101/02/03/+	2	5 01/02/03/+	2
6 0101/0201/+	1	6 0101	1
7 02	1	7 0101/02/+	3
8 03	2	8 0101/02/03/+	15
9 0301	8	9 0101/02/03+/0201	1
10 0301/03	13	10 0103	1
11 52	1	11 53	1
12 DRB3	1	12 DRB4	4

Sample :H1503R		Sample :H1504R	
Allele:DRB5*0102		Allele:DRB5*0102	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入	31	1 未記入	30
2 01	4	2 01	3
3 01/02	10	3 01/02	10
4 0101/02/+	1	4 01/02/03/+	1
5 0101/02/03/+	3	5 0101	1
6 0101/02/05	1	6 0101/02/+	1
7 0102	7	7 0101/02/03/+	3
8 0102/03	2	8 0101/02/05	1
9 0102/03/+	3	9 0102	6
10 0102/03/08/+	3	10 0102/03	2
11 0102/03/08+/0203	1	11 0102/03/+	3
12 0102/03/08N	1	12 0102/03/08/+	3
13 0102/03/08N/+	1	13 0102/03/08+/0203	1
14 51	1	14 0102/03/08N	1
15 DRB5	3	15 0102/03/08N/+	1
		16 51	1
		17 DRB5	3

Sample :H1505R		Sample :H1506R	
Allele:DRB5*0102		Allele:DRB5*0102	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入	39	1 未記入	38
2 01	4	2 01	4
3 01/02	7	3 01/02	7
4 0101	1	4 0101	1
5 0101/02/03/+	1	5 0101/02/03/+	2
6 0102	5	6 0102	5
7 0102/03	2	7 0102/03	2
8 0102/03/+	2	8 0102/03/+	2
9 0102/03/08/+	3	9 0102/03/08/+	3
10 0102/03/08+/0203	1	10 0102/03/08+/0203	1
11 0102/03/08N	1	11 0102/03/08N/+	1
12 0102/03/08N/+	1	12 0102/03/09	1
13 DRB5	2	13 DRB5	2
14 N.D.	1	14 N.D.	1
15 N.T.	2	15 N.T.	2

表 6 HLA-DQA1 ローカス表記の集計

Sample :H1501R			
Allele:DQA1*0102		Allele:DQA1*0503	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0101/02/04/+	1	1 0301/09	1
2 0101/02/04/+	1	2 0501/02/03/+	1
3 0102	1	3 0501/03/05	2
4 0301	1	4 0602	1
5 0602/11/16	1		

Sample :H1502R			
Allele:DQA1*010201		Allele:DQA1*0301	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0101/02/04/+	1	1 0301/02	1
2 0101/02/04/+	1	2 0301/02/03	2
3 0102	1	3 0302/07	1
4 0604	1	4 0302	1
5 06041	1		

Sample :H1503R			
Allele:DQA1*0103		Allele:DQA1*0103	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0103	3	1 未記入	1
2 0601	2	2 -	3
		3 0103	1

Sample :H1504R			
Allele:DQA1*0103		Allele:DQA1*0103	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0103	3	1 未記入	1
2 0601	2	2 -	3
		3 0103	1

Sample :H1505R			
Allele:DQA1*0103		Allele:DQA1*0103	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0103	3	1 未記入	1
2 0601	2	2 -	3
		3 0103	1

Sample :H1506R			
Allele:DQA1*0103		Allele:DQA1*0103	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0103	3	1 未記入	1
2 0601	1	2 -	2
		3 0103	1

表7 HLA-DQB1 ローカス表記の集計

Sample :H1501R			
Allele:DQB1*030101		Allele:DQB1*0602	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入	33	1 未記入	33
2 03	1	2 06	5
3 0301	12	3 0601/02/+	2
4 0301/04/+	1	4 0601/02/03/+	7
5 0301/04/09	2	5 0602	13
6 0301/04/09/+	7	6 0602/03/07/+	1
7 0301/09	2	7 0602/11	1
8 0301/09/13	5	8 0602/11/15/+	4
9 0301/11	1	9 0602/11/16	2
10 0301/13	1		
11 030101	1		
12 03011	1		
13 07	1		

Sample :H1503R			
Allele:DQB1*060101		Allele:DQB1*060101	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入	34	1 未記入	34
2 06	4	2 -	32
3 0601	21	3 0303/06/12	2
4 0601/02/+	2		
5 0601/02/03/+	7		

Sample :H1505R			
Allele:DQB1*060101		Allele:DQB1*060101	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入	42	1 未記入	42
2 06	1	2 -	22
3 0601	16	3 N.D.	3
4 0601/02/+	1	4 N.T.	1
5 0601/02/03/+	4		
6 N.D.	3		
7 N.T.	1		

Sample :H1502R			
Allele:DQB1*0302		Allele:DQB1*060401	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入	32	1 未記入	32
2 03	1	2 06	5
3 0302	15	3 0601/02/+	2
4 0302/05/+	2	4 0601/02/03/+	7
5 0302/05/07/	1	5 0601/02/04/+	1
6 0302/05/07/+	9	6 0604	15
7 0302/07	3	7 0604/05/06/+	1
8 0302/08/11	4	8 0604/09	1
9 08	1	9 06041	4

Sample :H1504R			
Allele:DQB1*060101		Allele:DQB1*060101	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入	32	1 未記入	32
2 06	5	2 -	34
3 0601	21	3 0303/06/12	2
4 0601/02/+	2		
5 0601/02/03/+	8		

Sample :H1506R			
Allele:DQB1*060101		Allele:DQB1*060101	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入	42	1 未記入	42
2 06	1	2 -	22
3 0601	17	3 N.D.	2
4 0601/02/+	1	4 N.T.	2
5 0601/02/03/+	3		
6 N.D.	2		
7 N.T.	2		

表8 HLA-DPB1 ローカス表記の集計

Sample :H1501R			
Allele:DPB1*0401		Allele:DPB1*0402	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0401	6	1 0402	6

Sample :H1502R			
Allele:DPB1*0402		Allele:DPB1*0401	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0402	6	1 -	1
		2 1601	5

Sample :H1503R			
Allele:DPB1*0202		Allele:DPB1*0901	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 02/47	1	1 0901	6
2 0202	5		

Sample :H1504R			
Allele:DPB1*0202		Allele:DPB1*0901	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 -	1	1 0901	6
2 0202	4		
3 1901	1		

Sample :H1505R			
Allele:DPB1*0901		Allele:DPB1*0901	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0901	4	1 -	4

Sample :H1506R			
Allele:DPB1*0202		Allele:DPB1*0901	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0202	3	1 0901	2
2 N.D.	1	2 1701	1
		3 N.D.	1

多く見られ、6桁目の「N」の表現については、基本的には原則には沿わない結果表記である。

3. まとめ

「検査結果(ワークシート)記載法と結果報告書表記法およびアンビギュイティ (ambiguity) の取扱いの原則 (2003年度版)」が本学会の HLA 標準化委員

会から提示される。その中で、「2桁レベル(粗分別, low-resolution) のタイピングを実施した場合は、2桁でアリルを表記するものとし、4桁レベルでアリルを表記してはならない」とした内容の表記法が提示されている。この原則は、あくまでも2桁レベルのタイピング結果を、4桁レベルのアリル表記にすることを禁じたもので、使用キットに応じて、どう

いうアリルが区分で出来るのか、使用者として知っておくべき事項であり、最低限 QC ワークショップの結果においては、区分出来ないアリル(アンビギュイティ)の取り扱いに従って結果を表記する方が適切だと思う。

最近、「Nomenclature for factors of the HLA system, 2002」において HLA アリルの命名法の変更が報告され、使用桁数では、これまで5桁目だけでアミノ酸同義置換のアリルの区分を行なっていたが、今後5桁目と6桁目の2桁で同義置換を区分することとなった(詳細は、本学会誌 MHC を参照)。今回の結果表記においても、一部の施設で対応されていたが、今後は5桁目以降の表記法について徹底する必要があると思われた。

「アリル表記法と結果報告の原則について 2002」では、日本人に見られる4アリル(B*4003, B*4004, B*4007, B*1529)に対応する HLA 抗原型を別表で示しているが、3アリル(B*4003, B*4004 および

B*4007)については、既に WHO 命名報告 2000 で HLA 抗原型は別表と同様の HLA 抗原型が定義されているが、B*1529については、B15 のままであった。「Nomenclature for factors of the HLA system 2002」では、日本人に関わるアリルでは、以下のアリルについて変更があった。

アリル	2000 命名報告	2002 命名報告
B*1528	B15	B62(15)

また、標準化委員会での提言案として、以下の対応抗原について提唱を行なう必要があると思われる。

アリル	2002 命名報告	委員会の提言(案)
A*2420	—	A24
B*5603	B22	B56(22)

● 個別報告 ●

3 種の SBT システムを用いたタイピング結果の検討

吉川枝里, 河田寿子, 重成敦子, 志知大輔, 成瀬妙子

東海大学基礎医学系

1. はじめに

我々の研究室では、主に SBT (Sequencing Based Typing) 法を用いてタイピングを行っている。現在数種の SBT キットが販売されているが、今回我々が、QC (Quality Control) のタイピングに用いたのは、ABI 社 (HLA High Resolution Typing System), Forengic 社 (Allele SEQR HLA), VISIBLE 社 (Gene kit HLA) の3つのシステムである。以前我々が、ABI と VISIBLE の2種の SBT システムにおけるタイピング結果を検討したところ、両者の結果は完全に一致し高い再現性が認められた¹⁾。しかし、今回の解析の結果、いくつかの検体において不一致が生

じるなどの問題が見られた。今回は、解析の際生じた4つの問題点について考察したので報告する。

2. 問題点と考察(表1)

2-1. H1502R HLA-A, B: 異なる対立遺伝子をもつセルライン DNA を等量で混合した検体を解析した結果、VISIBLE においては、回答と一致したが、Forengic と ABI においてはホモの判定となり、片方の対立遺伝子が検出されなかった。

同じ SBT 法の中でも、VISIBLE ではヘテロと判定可能であったのに対し、Forengic, ABI では片方の対立遺伝子が検出されなかった理由として考

表1 解析の結果問題のあったタイピング結果

	H1502				H1503		H1504	
	A*		B*		A*		C*	
Forengic	2501		5101	4402	0201	2402	1202	
ABI	2501		5101		0201	2402		
VISIBLE	2501	3201	5101	4402	0201	2402	1202	
SSP	25	32			02	24	01	1202
答	2501	3201	5101	4402	0207	2402	(0102)	1202
	WT47: BM92 =1:1				TAB: AKIBA =1:1		TAB: AKIBA =1:10	

えられるのは、シーケンス方法の違いである。VISIBLEは、プライマーに蛍光標識するDye primer法を用い、ForengicとABIはダイデオキシに標識するDye Terminator法を用いている。それぞれの塩基を別々のチューブで蛍光反応させるDye primer法に対し、Dye Terminator法は、それぞれ違う蛍光を標識したデオキシを一本のチューブ内で反応させる。そのため、蛍光同士の打ち消しが生じた可能性が考えられた。通常のタイピングにおいてもヘテロ部分で片方のピークが低くなることはしばしば見受けられるが、判定の際ヘテロと予測できる程度の高さは得られる。しかし、今回は2種の検体を混合させた特殊な状態であったため、通常よりも打ち消しが激しくなったと考えられた。

また、等量混合したにもかかわらず片方のハプロタイプが検出不能な理由として、タイプにより蛍光の付加の度合に差があることが考えられた。

2-2. H1504 HLA-Cw: 異なる対立遺伝子をもつセルラインDNAを1:10の割合で混合させた検体を解析した結果、SBT3種ともにホモと判定した。実際の波形を見てもCw*01のピークがかすかに認められるが、この場合ヘテロと判定するには至らない(図1)。

我々は、SBT法の結果を評価するためにSSP(Sequence Specific Primers)法を用いることがあり、この検体についてSSPを行った結果、Cw*01が検出された。SSPはPCRが主体の方法であるため、

DNA量が不均一であっても、増幅量に問題なく、少量のDNAでも判定可能である。しかしその反面コンタミなども同時に増幅してしまう可能性も考えられた。これに対して、SBT法では、検体のDNA濃度が極端に薄い場合、濃い方にうち消される現象が見られたため、コンタミの影響を受けにくいと考えられた。

2-3. H1503R HLA-A: TABとAKIBAを等量で混合させた検体(A*0207, 2402)を解析した結果、SBT3種でA*0201, 2402と判定された。A*0201と0207は、コドン123の2番目の塩基がAかGかの違いで判別される。今回得られた波形はピークの乱れがひどく、存在しないはずのAが3法ともに認められたため、判定が困難なものとなった。ただし本検体については他法でも同様の結果が複数得られており、検体の精査が必要であると思われる。

このようにSBT法は、解析の重要な部分を目読で行うため、綺麗な波形が得られない場合ミスタイプをする可能性が他法よりも高いが、他方、コンタミやキメリズム様の検体については、混入したDNAの影響を排除して正しい遺伝型を検出可能なことも考えられた。

2-4. ABIにおいて、混合させた検体のいくつかで十分な波形が得られたにもかかわらず、解析不能なものが存在した。

その理由として解析ソフトの違いが考えられた。VISIBLEで用いているソフトでは、得られた生デー

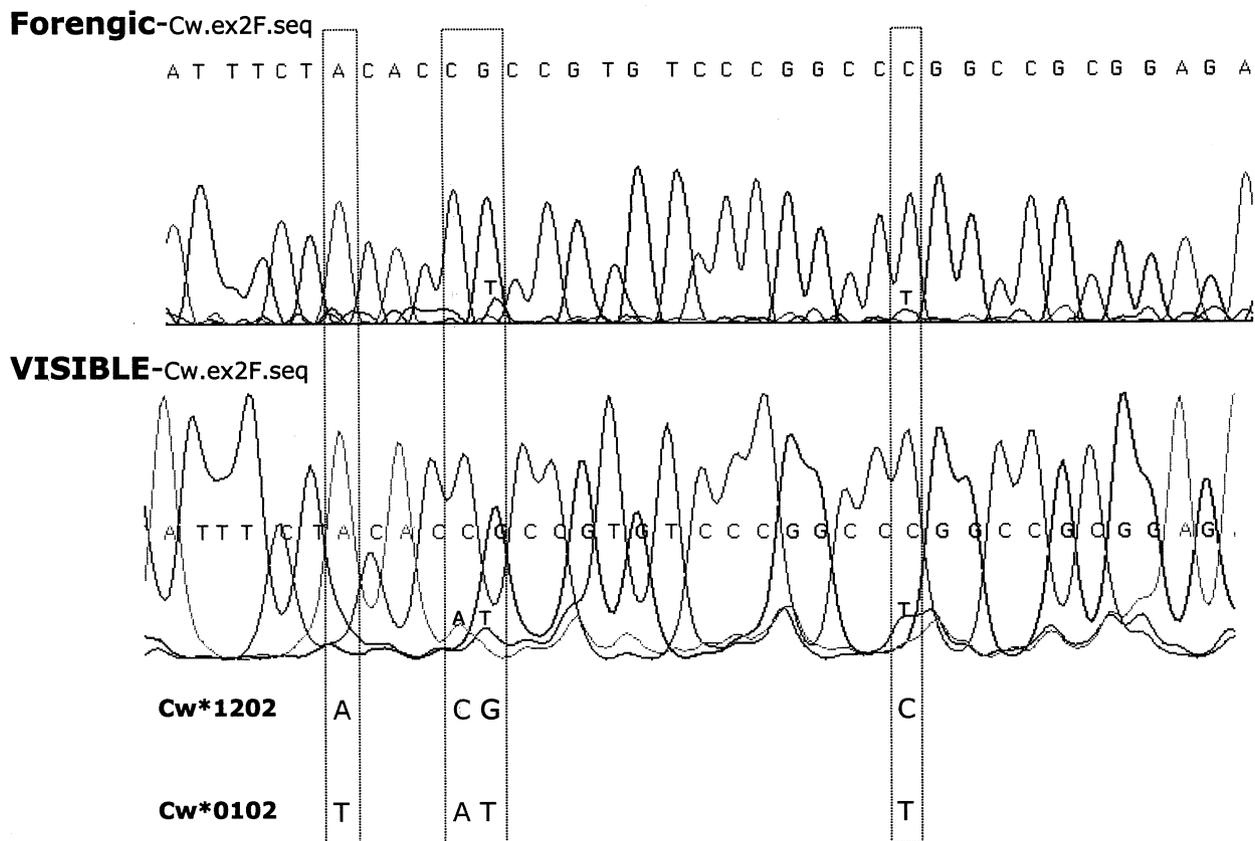


図1 Forengic 及び VISIBLE での H1504 の HLA-C タイピング結果

タから、まず広範囲の候補が得られ、検体の波形データと塩基配列を候補タイプの塩基配列と比べながら消去法によるタイピング解析を行うことができる。これに対し、ABI ソフト (Matchtool1.0, MT Navigator1.0) では、得られた生データを見ながら修正し、その後ソフトにて候補が選出される。そのため、特徴的な多型を拾ったとしても、最終的に 3-4 bp 不一致があると候補タイプすら得られないことがある。

ABI ソフトでは、波形の確認を目読で行うため、多型部を見落とした可能性があり、更に今回特殊な検体であったため、それぞれの多型部位に蛍光が均一に付加せず、ヘテロ部分が不明瞭な波形になった可能性も考えられた。Forengic においても、判定作業には通常の数倍も時間がかかり判定が困難であった。

3. まとめ

異なる 3 種のシステムを用いて SBT タイピング

を行った結果、それぞれのシステムのタイピング結果に違いが見られた。

SBT 法では 2 種の検体が混在した場合、蛍光同士の打ち消しや、多型部位の蛍光反応が不均一となる現象がみられた。また、DNA 量が少ない方が濃い方にうち消される現象もみられたことから、SBT 法はコンタミなどの影響を受けにくいと考えられた。しかし、SBT 法は解析の重要な部分を目読で行うため、ミスタイプをする可能性が他法よりも高く、従って判定は注意深く行う必要がある。

このように、SBT にもシステム、キットによりそれぞれ性格があり、その性格を理解することで、さらに効率よく信頼性のあるデータが得られると思われる。

追記

本文中 2-3 で指摘した波形の乱れについては、本ワークショップレポートの経過でも述べられている通り、解析に用いたセルライン TAB が、A*0201、

*0207 のヘテロ接合であることに由来すると確認されたため、解決した。

HLA sequencing Assay (VISIBLE 社)と Sequencing based typing Kit (Applied Biosystems 社)法の比較検討, MHC 9: 8-13, 2002.

文 献

- 1) 吉川枝里, 中島舞子, 河田寿子ら: Gene Kit