

MHC

日本組織適合性学会誌

Major Histocompatibility Complex

Vol. 11 No. 1, 2004

Contents

日本組織適合性学会からのお知らせ

第13回日本組織適合性学会大会のご案内	1
第8回HLA-DNAタイピングQCワークショップのご案内	5
平成16年度認定HLA検査技術者講習会のご案内	6
平成16年度認定HLA検査技術者試験実施要領	7
HLA標準化委員会からのお知らせ	8

[原著論文]

HLA-A欠失によるHLA-A非発現型の発見

..... 林 律子, 渡辺嘉久, 石川善英, 柏瀬貢一, 山崎雅子, 内野郁世 伊村公良, 興津 馨, 浅井隆善, 小松孝良, 清水勝則	11
--	----

愛媛県の228家系におけるHLA遺伝子頻度とハプロタイプ分布

..... 奥山正明, 鳥谷竜哉, 竹内潤子, 井上博雄	17
------------------------------	----

第7回HLA-QCワークショップ報告

全体報告	木村彰方, 中島文明, 丸屋悦子, 酒巻建夫, 小林 賢 柏瀬貢一, 太田正穂, 安波道郎, 田中秀則 他	25
------------	--	----

個別報告	吉川枝里 他	74
------------	--------	----

第2回日本組織適合性学会近畿地方会抄録	79
---------------------------	----

〈日本組織適合性学会誌 MHC 投稿規定〉	97
-----------------------------	----

編集後記	99
------------	----

日本組織適合性学会誌 MHC 編集委員会

編集委員長

徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野

編集委員

間 陽子 理化学研究所分子ウイルス学研究ユニット
猪子 英俊 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門
大谷 文雄 北里大学医学部免疫学講座
木村 彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患部門
小林 賢 日本薬科大学生物学研究室
中島 文明 神奈川県赤十字血液センター検査部
成瀬 妙子 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門

編集協力者

石川 善英 日本赤十字社中央血液センター
石谷 昭子 奈良県立医科大学法医学教室
今西 規 産業技術研究所生物情報解析研究センター
太田 正穂 信州大学医学部法医学教室
小河原 悟 福岡大学病院第4内科
柏瀬 貢一 東京都赤十字血液センター検査部
斎藤 敏 長野県赤十字血液センター検査課
佐治 博夫 HLA 研究所
佐田 正晴 国立循環器病センター研究所再生医療部移植外科
高原 史郎 大阪大学医学部泌尿器科学講座
滝口 雅文 熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野
西村 泰治 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学教室
能勢 義介 兵庫県赤十字血液センター検査課
平山 謙二 長崎大学熱帯医学研究所環境医学部門
福西 孝信 兵庫県立西宮病院腎移植センター
前田 平生 埼玉医科大学総合医療センター輸血細胞治療部
丸屋 悦子 HLA 研究所
森島 泰雄 愛知県がんセンター血液化学療法部
脇坂 明美 日本赤十字社血漿分画センター

● Contents ●

日本組織適合性学会誌 第 11 卷第 1 号 平成 16 年 5 月 31 日発行

日本組織適合性学会からのお知らせ

第 13 回日本組織適合性学会大会のご案内	1
第 8 回 HLA-DNA タイピング QC ワークショップのご案内	5
平成 16 年度認定 HLA 検査技術者講習会のご案内	6
平成 16 年度認定 HLA 検査技術者試験実施要領	7
HLA 標準化委員会からのお知らせ	8

[原著論文]

HLA-A 欠失による HLA-A 非発現型の発見

..... 林 律子, 渡辺嘉久, 石川善英, 柏瀬貢一, 山崎雅子, 内野郁世 伊村公良, 興津 馨, 浅井隆善, 小松孝良, 清水勝則	11
--	----

愛媛県の 228 家系における HLA 遺伝子頻度とハプロタイプ分布

..... 奥山正明, 鳥谷竜哉, 竹内潤子, 井上博雄	17
------------------------------	----

第 7 回 HLA-QC ワークショップ報告

全体報告	木村彰方, 中島文明, 丸屋悦子, 酒巻建夫, 小林 賢 柏瀬貢一, 太田正穂, 安波道郎, 田中秀則 他	25
個別報告	吉川枝里 他	74

第 2 回日本組織適合性学会近畿地方会抄録	79
-----------------------------	----

〈日本組織適合性学会誌 MHC 投稿規定〉	97
-----------------------------	----

編集後記	99
------------	----

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

JSHI

第13回日本組織適合性学会大会のご案内

第13回日本組織適合性学会大会
大会長 佐田 正晴

皆様におかれましては益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

第13回日本組織適合性学会大会を下記の要領にて開催いたします。本大会では臨床家との相互理解を深めると共に接点を求めるために、「MHC:基礎と臨床のバリアフリーと協調を目指して」をメインテーマにいたしました。

また移植に関する「市民公開講座」も企画しております。

多くの皆様の御参加をお待ちいたしております。

会 期: 2004年9月23日(木・祭)～9月25日(土)

会 場: 千里ライフサイエンスセンター

〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2

TEL. 06-6873-2010

FAX. 06-6873-2011

会場および会場へのアクセスは下記HPをご参照下さい。

HP. <http://www1.senri-lc.co.jp>

大会内容

以下の学術プログラムを予定しています。

1. 特別講演・教育講演

- 「Immunologic monitoring of transplant patients」
Paul. I. Terasaki (Terasaki Foundation Laboratory, USA)
- 「移植における免疫寛容導入：同種移植から異種移植へ」
山田 和彦 (Transplantation Biology Research Center, Massachusetts General Hospital, USA)
- 「幹細胞を用い再生医療の現状と問題点」
中畑 龍俊(京都大学医学部発生発達医学)
- 「造血幹細胞移植におけるNK細胞受容体適合性の意義」
屋部 登志雄(東京都赤十字血液センター技術部研究一課)

2. シンポジウム・ワークショップ(予定)

- 「造血幹細胞移植」
- 「移植医療におけるHLAタイピングの標準化」
- 「特殊疾患・症例のHLAタイピング」

3. 一般演題

4. 市民公開講座(予定パネリスト)

- Paul. I. Terasaki (Terasaki Foundation Laboratory, USA)
- 河野 太郎(衆議院議員)
- 小寺 良尚(名古屋第一赤十字病院・骨髄移植センター長)
- 一戸 辰夫(京都大学大学院医学系研究科血液腫瘍内科)

- 植岡 健一(日経メディカル編集部 骨髄移植推進財団・前事務局長)
- 5. ランチョンセミナー
「臓器移植」
「造血幹細胞移植」
- 6. イブニングセミナー
「医用ミニブタの医学・生物学的応用」

一般演題募集要項

1. 発表形式

発表形式は口演またはポスターにより行います。演者は本学会員であることが必要です。発表形式(口演またはポスター)に関しましてはプログラム委員会に一任いただきたく存じます。

2. 申し込み方法

1) 抄録形式

- 抄録は Microsoft Office Word のテキストファイルを用い作成下さい。
- 演題名, 演者(発表者に○印), 所属(正式名称が長い場合には省略所属名), 本文の順で作成下さい。
- 本文は 800 字以内を厳守し, 目的, 方法, 結果, 考察などに分類し記載下さい。英数字は半角文字を使用し, 2 文字で 1 字とします。

2) 演題申し込み票ファイルの作成

- 抄録とは異なるファイルを作成下さい。
- 演題名, 演者, 所属, 代表者の連絡先住所, 電話番号, FAX, e-mail アドレスを必ず記載下さい。

3) e-mail による演題申し込み

- 演題受付は原則として e-mail 受付のみといたします。
- 件名は「13JSHI 演題」とし, ① 抄録, ② 演題申し込み票ファイルの 2 つのファイルを, 添付書類にて第 13 回大会事務局アドレスに送って下さい。

3. 演題申し込み締め切り

2004 年 5 月 31 日(月)必着

締め切り延長などは日本組織適合性学会 HP で随時更新します。

4. 演題受理通知および採択通知

- 演題受付後 7 日以内に, e-mail または FAX にて演題受理を通知いたします。
- 演題発表形式(口演またはポスター)および発表日時につきましては, 2004 年 7 月下旬頃までに, e-mail または FAX にて通知いたします。

2004 年度 TFB 学術奨励賞の募集

参加登録費

下記, 事前登録を行います。

参加費

	理事・評議員	会 員
事前登録 (2004年8月31日迄)	¥8,000	¥6,000
当日参加 (2004年9月1日以降)	¥10,000	¥8,000

事前登録参加費は下記の銀行口座に振り込みお願いいたします。参加証(領収書兼用)は、学会当日に受付にてお渡しします。尚、振込の際に氏名の後に会員番号を必ずご記入下さい。

〈振込先〉

りそな銀行 千里北支店

(普通) 6219903

第13回日本組織適合性学会大会 大会長 佐田正晴(さだまさはる)

懇親会

2004年9月24日(金) 18:30より千里阪急ホテルプールサイド(雨天の場合は屋内)にて懇親会を開催いたします。

神戸女子大学音楽学部「音楽によるアウトリーチ」によるコンサート

宿泊・交通の御案内

本大会に御参加の皆様には、近畿日本ツーリストが宿泊、交通の手配をいたします。下記アドレスにアクセスいただきお早めにお申し込み下さい。

- 第13回日本組織適合性学会宿泊・近畿日本ツーリストアドレス
<http://www.lhweb.jp/knt/soshiki/sanka.html>

会場までの交通案内 (HP. <http://www1.senri-lc.co.jp>)

会場の最寄り駅は、地下鉄御堂筋線・千里中央駅、大阪モノレール・千里中央駅です。

- 大阪伊丹空港から大阪モノレールで約13分
- 新大阪駅から地下鉄御堂筋線で約13分
- 大阪梅田から地下鉄御堂筋線で約19分

大会事務局

本大会に関するお問い合わせ、一般演題、2004年度TFB学術奨励賞の応募は、下記大会事務局にお願いいたします。

〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1

国立循環器病センター研究所 再生医療部内

第13回日本組織適合性学会大会事務局

事務担当: 鳥山 恵

TEL. 06-6833-5012 内線 2516, 2362 FAX. 06-6835-5496

E-mail. megutori@ri.ncvc.go.jp

その他

- QC ワークショップ，認定制度講習会，認定試験につきましては本号別項を参照下さい。
- 大会最新情報は日本組織適合性学会 HP で随時更新しますのでご参照下さい。

第8回 HLA-DNA タイピング QC ワークショップのご案内

日本組織適合性学会
 認定制度委員会
 委員長 佐田正晴
 QC ワークショップ部会長 木村彰方

認定制度委員会主催の QC ワークショップ (QCWS) 集会を開催致しますので、下記の通り案内致します。サンプルのタイピングを実施しない方々も、HLA-DNA タイピング技術を巡る知識のアップデートのために QCWS 集会へ参加下さい。

記

1. 日 時：平成 16 年 9 月 23 日(木、祝日) 13:00-15:50
2. 場 所：千里ライフサイエンスセンター 5 階 ライフホール
3. 参加費：QCWS 集会のみの参加は、資料代等の実費として一名 2,000 円を申し受けます。申し込みをされた方々には、8 月下旬に QCWS 集会の資料 (CDR などの電子媒体)を施設単位で送付する予定です。
4. 参加申し込み：申し込み時に「QCWS 集会のみの参加」と明記してください。
 学会ホームページ QC ワークショップ部会の URL (<http://jshi.umin.ac.jp/QCWS/>) より申し込んで下さい。あるいは、前記 URL より申し込み様式をダウンロードし、必要事項を記入後、メール添付にて QCWS 部会まで送付ください。なお、電子媒体の使用が困難な場合には、ファックスまたは郵送でも受け付けますので、MHC Vol. 10 No. 3 (page 10) に掲載の第 8 回 HLA-DNA タイピング QC ワークショップ参加申込書を使用してください。参加費の払い込みをもって参加申し込みの完了と致しますので、参加費は以下の口座に振込んでください。原則として、振込みの控えをもって領収書とさせていただきます。
5. 締めきり：
QCWS 集会のみの参加の場合の申し込み締めきりは、平成 16 年 6 月 25 日(金)とします。QCWS 集会は当日参加も例外的に受け付けますが、その場合は資料が準備出来ないことがありますので、原則として事前に参加申し込みをしてください。
6. 振込み口座
 みずほ銀行 厚木支店
 普通預金 8037067
 JSHI 認定制度委員会事務局 猪子英俊

平成 16 年度 認定 HLA 検査技術者試験実施要領

組織適合性技術者認定制度委員会

委員長 佐田 正晴

組織適合性技術者認定制度委員会試験問題検討部会

部会長 徳永 勝士

認定 HLA 検査技術者及び認定組織適合性指導者認定制度規則(以下「規則」という。)に基づき認定 HLA 検査技術者資格認定試験を下記のごとく実施する。なお、研修場所・日時に関しては後日申請者に文書で通知する。

平成 17 年度に受験を予定している者は、講習会のみ今年度に受講しておくこと。平成 18 年度以降に受験を予定している者も講習会の受講は可能である。なお、講習会の詳細については 6 頁の「講習会開催のご案内」をご覧ください。

- 1 申請資格: 認定 HLA 検査技術者の認定試験受験資格基準は、申請の前年度までに次の各項のすべてを備えていなければならない。(1) 日本組織適合性学会(以下「学会」という。)の会員歴が通算して 3 年以上あること。(2) 組織適合性検査に関する業務経験が 3 年以上あること。(3) 5 年間で技術者履修課程に定められた講習の受講歴があること。(4) 5 年間で資格審査基準が 30 単位以上あること。但し、当学会の大会への参加が 5 単位以上含まれていなければならない。なお、(2) の業務とは、組織適合性に関する検査、研究及び教育をいう。
- 2 申請書提出期限: すでに締切りました。
- 6 実技研修会: 日時、場所等は申請者にメールまたは文書で通知する。
7 月から 8 月中の 2 ないし 3 日間(施設によって異なる)を予定している。開催都市は、東京、神奈川、京都、大阪、福岡を予定している。
- 7 実技・筆記試験: 筆記: 平成 16 年 9 月 23 日(木) 16 時 00 分から 17 時 00 分(時間が変更になりました。)
会場: 千里ライフサイエンスセンター(大会会場)
実技: QC ワークショップの参加歴がある場合には免除される。
QC ワークショップの参加歴がない場合には実技研修評価をもって実技試験に換える。

HLA 標準化委員会からのお知らせ

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 年度改訂版)日本組織適合性学会 HLA 標準化委員会
(2004 年 4 月 6 日改訂)

I. 検査結果(ワークシート)の表記法について

1. 2桁レベル(粗分別, low resolution)で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。また、アンビギュイティ (ambiguity) のある結果を記載する場合は、下記の「II. アンビギュイティ (ambiguity) の取扱いについて」に従う。2桁レベルで区別できないアリルが存在する場合は、区別のできる別な試薬キットまたは方法を用いてアリルを区別することが望ましい。
2. 4桁レベル(細分別, high resolution)でタイピングを実施した場合は、4桁でアリルを表記するものとする。ただし、5桁以上の細分化が知られているアリルで、5桁以上でアリルが特定できた場合にのみ、その桁数でアリルを記載する。また、4桁レベル以上のタイピングでアンビギュイティのある結果が得られた場合は、それらのアリルが区別できる別な試薬キットまたは方法を使用してアリルを判別することが望ましい。
3. ひとつのカラム(セル)に2種類のアリルを記載する場合は、それぞれを「,(カンマ)」で区切る。
例1 「HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*13」(2種類のアリルがヘテロ接合で検出された場合)
例2 「HLA-DRB1*11, -」(アリルが一つしか検出されなかった場合は、検出されたアリルを最初に書き、「,」を付した後に「-」を書く)
4. ふたつのカラム(セル)に2種類のアリルを記載する場合は、それぞれのアリルをそれぞれのカラムに記載する。アリルが一つしか検出されなかった場合は、後ろのカラムに「-」を記載する。家系調査によりホモ接合と判定された場合は同じアリルをそれぞれのカラムに記載することが従来おこなわれていたが、この場合についても、アリルが一つしか検出されていないため「-」で記載することが望ましい。これは、次の5.の場合と区別するためである。
5. 同じアリル群に属していても明らかに異なるアリルが二つ検出された場合には、それぞれのカラムにアリルを記載する。
例1 「HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*11」は、明らかに区別できる HLA-DRB1*11 アリルがある場合 (HLA-DRB1*11 のヘテロ接合) に使用する。「HLA-DRB1*1101/04/06/+」と反応するプライマーセットと「HLA-DRB1*1102/14/16/+」に反応するプライマーセットの両方に反応しているような場合に使用する。
参考1 「HLA-DRB1*11, -」は区別できない HLA-DRB1*11 アリルがある場合 (HLA-DRB1*11 のホモ接合の場合を含む。なお、家系調査によってホモ接合が確認されている場合には、コメント欄にその旨を記載する)

参考2 判定されたアレル以外に明らかに異なるアレルの存在が疑われるが、そのアレルを特定できない場合は、「HLA-DRB1*11, nd」と判定できたアレルの後ろに「, nd」などと記載してもよい。ただし、このような表記はあまり望ましくないが、他の検査キットや別の方法を用いてもアレルを特定できない場合など、やむ終えない場合にのみ使用すること。

II. アンビギュイティ (ambiguity) の取扱いについて

区別できないアレルが2種類以上存在する場合には以下に従う。

1. 最も番号の若いアレルを4桁で最初に表記し、その後に「/(スラッシュ)」を入れ、2つ目以降のアレルは3桁目と4桁目の2桁の数字のみを記載する。
 - a. 区別の付かない4桁アレルが2つ存在する場合は以下のように表記する。
例 「HLA-DRB1*1501/03」(HLA-DRB1*1501とHLA-DRB1*1503が区別できない場合)
 - b. 区別の付かない4桁アレルが3つ存在する場合は以下のように表記する。
例 「HLA-DRB1*1301/02/16」(HLA-DRB1*1301, HLA-DRB1*1302とHLA-DRB1*1316が区別できない場合)
 - c. 区別の付かない4桁アレルが4つ以上存在する場合には、番号の若い順に3アレルを記し、最後に「/+」をつける。
例 HLA-DRB1*0401/03/04/+
2. 検査試薬キットに添付されている判定表には4桁と6桁のアレルが混在表記されている場合があるが、6桁アレルは使用しない。
例 判定表に「HLA-DRB1*150101 - 13」と書かれている場合、「HLA-DRB1*150101/02/03/+」とは記載せず、「HLA-DRB1*1501/02/03/+」と記載する。
3. 上2桁レベルが異なる4桁アレルが複数存在する場合には、4桁表記を「/(スラッシュ)」でつなぐ。
例 アレルが2つの場合、「HLA-DRB1*1501/1601」と記載する。
3つの場合以上の場合、「HLA-DRB1*1501/1602/+」と記載する。
4. 上2桁レベルが異なる2桁アレルが複数存在する場合は、2桁表記を「/」でつなぐ。ただし、2桁レベルで区別できないアレルが存在するようなアンビギュイティタイプピングは望ましくないため、このような表記は原則として採用しない。
例 アレルが2つの場合、「HLA-DRB1*15/16」と表記する。
3つの場合、「HLA-DRB1*08/11/12」と表記する。
4つの場合以上の場合、「HLA-DRB1*08/11/12/+」と表記する。
5. 2桁レベルでも可能性のあるヘテロの組み合わせが複数存在し、それらが区別できない場合は、代表的なアレルに「//+」をつけて表記する。
例 HLA-B*3501, *5101; HLA-B*3511, *5109; HLA-B*5301, B*7802 という3種類のヘテロの組み合わせが区別できない場合は、「HLA-B*3501//+, HLA-B*5101//+」と表記する。

III. 結果報告書の表記法について

1. 2桁レベル(粗分別, low resolution)でタイプピングのみを実施した検査の場合

- a. 粗分別タイピングのみを実施した場合は、原則的に2桁レベルで報告するものとするが、「HLA型」で結果を報告してもよい。4桁レベルでアレルを報告してはならない。報告書への記載については「I. 検査結果(ワークシート)の記載法について」の3と4に従う。従来使用していた「血清対応型」を今後は「HLA型」とし、血清学で決めたものについては「HLA抗原型」と標記することとする。
- 例 HLA-DRB1*09 と判定場合は、HLA-DRB1*09 と報告する。HLA-DRB1*0901 (あるいは HLA-DRB1*090102) としてはならない。あるいは、「HLA-DR9」と報告してもよい。
- b. HLA型の推定は、WHO命名委員会報告に従う。ただし、WHO命名委員会でHLA型が不明な場合でも、日本組織適合性学会HLA標準化委員会において「HLA型」が確認されている場合(別表)には、その「HLA型」を記載する。
- 例 HLA-DRB1*0403/05/06/+ と判定された場合に、「HLA-DR4」と記載してもよい。
- c. WHO命名委員会と日本組織適合性学会HLA標準化委員会の何れでもHLA型が不明な場合は、アレルを2桁で結果報告書に記載する。その場合、備考欄に「このアレルは対応するHLA型がよく分かっていないためアレル名で記載してあります」などと説明を付記してもよい。
- d. 抗原対応部分(アレル名の上2桁の数字)で異なるアレルが複数混在し、区別できない場合は、それらのアレルが区別のできる別な試薬キットまたは方法を用いてアレルを区別した後に結果を報告することが望ましい。
- e. 判定されたアレルが一つで、それ以外に明らかに異なるアレルの存在が疑われるが、そのアレルを特定できない場合は、「nd」などと記載してもよい。ただし、このような表記はあまり望ましくないが、他の検査キットや別の方法論を用いてもアレルを特定できない場合など、やむ終えない場合にのみ使用する。その場合、備考欄に「HLA-DRB1*11以外にアレルの存在が疑われますので、精査中です」などと説明を付記することが望ましい。なお、家系調査によってホモ接合が確認されている場合は、コメント欄にその旨を記載する。

2. 4桁レベル(細分別, high resolution)でタイピングで実施した検査の場合

- a. 細分別度(high resolution)タイピングで実施した検査の結果報告書には、4桁以上のアレルを記載する(例1)。または、アレル名の後ろに括弧書きでそのアレルから推定されるHLA型のタイプを記載する(例2)。この場合、備考欄に「()内は、アレルに対応するHLA型を記載してあります」などと説明を付記してもよい。

例1 HLA-DRB1*1302

例2 HLA-DRB1*1302 (HLA-DR13)

別 表

アレル名	対応する HLA 型
HLA-B*1529	HLA-B70
HLA-A*2420	HLA-A24
HLA-B*5603	HLA-B56 (22)

● 原著論文 ●

HLA-A 欠失による HLA-A 非発現型の発見

林 律子¹⁾, 渡辺 嘉久²⁾, 石川 善英³⁾, 柏瀬 貢一³⁾, 山崎 雅子¹⁾, 内野 郁世¹⁾,
伊村 公良¹⁾, 興津 馨¹⁾, 浅井 隆善¹⁾, 小松 孝良⁴⁾, 清水 勝則⁵⁾

- 1) 静岡県赤十字血液センター
- 2) 日本赤十字社中央血液センター
- 3) 東京都赤十字血液センター
- 4) 静岡県浜松赤十字血液センター
- 5) 清水こどもクリニック

(平成 15 年 11 月 14 日受付)

要約: 新生児血小板減少症患者の家系調査で見つかった HLA-A 非発現型について解析した。この HLA-A 非発現型アリルは PCR-SSP 法, PCR-SBT 法では検出されなかった。5'-, 3'-非翻訳領域に設定した HLA-A ローカス特異的プライマーによる PCR でも増幅断片は得られなかった。パルスフィールド電気泳動法による HLA クラス I 領域の解析の結果, 約 10 kb の欠失が検出された。この HLA-A 非発現型は HLA-A 遺伝子の一部あるいは全長が欠失していると考えられた。

キーワード: HLA 遺伝子タイピング, PCR-MPH

はじめに

HLA の血清学的タイピングや low resolution の DNA タイピングでホモ接合と判定される検体の中には非発現型アリルや低発現型アリルが含まれる可能性がある。WHO HLA 命名委員会には HLA-A ローカスアリルだけですでに 18 種類の非発現型アリルが登録されており(1), このうちの A*0215N (2), A*2611N (AB005048) は日本人から見つかったアリルである。これら非発現型アリルのほとんどは 1 塩基置換, あるいは小規模な挿入, 欠失によるものであり, これらの変異が未知の部位に生じた場合は, DNA によるタイピングでは発現型のアリルとして判定されてしまうことが起こりうる。この情報に基づいて移植が行われれば, HLA 不適合移植という結果になる。

今回我々は新生児血小板減少を起こした症例の原因を調べるため, HLA タイピングを行ったところ, HLA-A 欠失によると思われる HLA-A 非発現型が見つかった。通常の HLA 検査では検出されない多型情報の集積は HLA 領域の研究や HLA タイピングの精度向上に重要と思われるので報告する。

材料と方法

1. 試料

新生児血小板減少症を発症した患者, 患者の兄と両親, 祖母, 伯母の血清学的検査を行った。患者の血小板減少症発症以外, この家族のメンバーには健康上の問題は認められていない。患者の父に遺伝子解析研究の説明をし, 同意を得て父と兄の末梢血有核細胞より DNA を抽出し, 試料として用いた。

代表者連絡先 〒420-0881 静岡県北安東 4 丁目 27 番 2 号
静岡県赤十字血液センター
林 律子

電話 054-247-7143
F A X 054-247-3163
E-mail siz.tec@shizuoka.bc.jrc.or.jp

2. 血清学的タイピング

HLA の血清学的タイピングは、Class I, Class II ともに愛知県赤十字血液センター製の自家製タイピングトレイを用い、LCT 法で行った。また B リンパ球分離はナイロンカラム法にて行った。HLA 抗体検査は、HLA タイピング同様 AHG-LCT 法を用いた。さらに赤血球抗原および抗体の同定には生食法、プロメリン法および間接抗グロブリン法で行った。血小板抗原および抗体の同定には MPHA (mixed passive haemoagglutination assay) 法を用いた。

3. 遺伝子解析

HLA-A ローカスの DNA タイピングは、PCR-SSP (sequence-specific primer) 法 (PEL-FREEZ 社, Wisconsin, USA), および PCR-SBT 法 (Forensic Analytical 社, California, USA) により行った。また、HLA-A ローカス特異的プライマー (AC-1F: 5'-ccagacgccgaggatggcc-3', A2-2: 5'-cgtggcccctggtaccgt-3') により exon 1~exon 4 を増幅し (95°C, 30 sec, 67°C, 30 sec, 72°C, 1 min, 30 cycles), TA cloning kit (Invitrogen) を用いてクローニング後、exon 2, exon 3 の塩基配列を解析した。HLA-A 全長の PCR は、5'-, および 3'-非翻訳領域に設定した HLA-A ローカス特異的プライマー (2) を用いて行った。パルスフィールドゲル電気泳動は、末梢血単核球より調製した超高分子 DNA を制限酵素 Mlu I で処理

し、1.5% アガロースゲルを用い、0.5×TBE 緩衝液中で、11°C, 160 V, パルスタイム 90 秒で 48 時間泳動した。泳動後、ナイロン膜に転写し、通常のサザン法による解析を行った。プローブは、HLA-A 遺伝子の近傍にある HLA-J (HLA-59) 遺伝子の 3' 側の断片である 59NH (3) を用いた。

結果

1. 血清学的解析

患者およびその家族の家系図、ならびに血清学的解析から得られた HLA ハプロタイプを図 1 に示す。患者の父親の HLA-A ローカスの表現型は A11.1/-, 患者の母親は A31/33 であるが、患者の兄は A31/- であり、矛盾する結果が得られた。したがって、患者の父親および兄はホモ接合ではなく、非発現型 (HLA-A blank) とのヘテロ接合と予想された。なお、赤血球型、血小板型のタイピング結果に親子関係の矛盾はなかった。

兄 (III-1), 父 (II-1), 伯母 (II-3) に A blank, B7, Bw6, Cw7, DR1, DQ1 ハプロタイプが共有されていた。祖母 (I-1) はこのハプロタイプを持たないことから、このハプロタイプはすでに亡くなっている祖父から遺伝したものと考えられた。

母親の血清中には HLA 抗体 (B7 + B51) を検出したが、赤血球、血小板に対する抗体は検出されず、他のメンバーの血清中にも、特記する抗体は検出さ

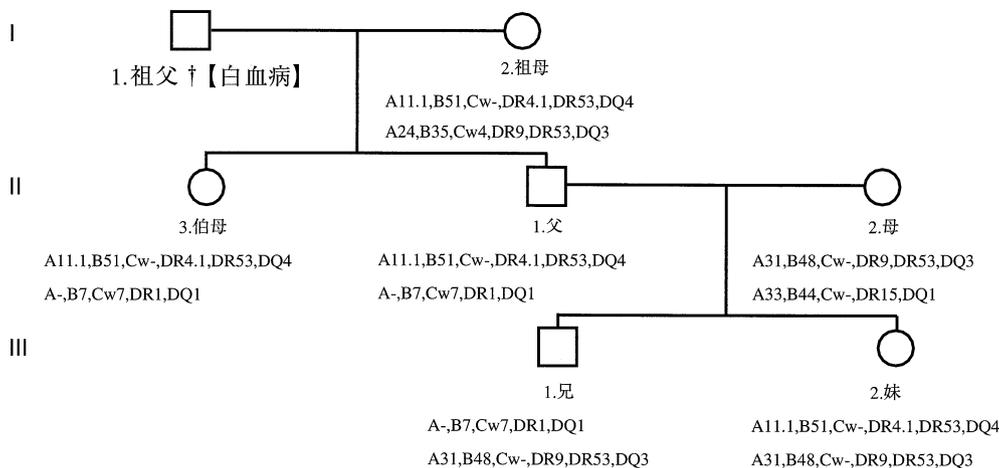


図 1 HLA-A ブランクが見つかった家族の家系調査

兄 (III-1), 父 (II-1), 伯母 (II-3) に HLA-A 非発現型をもつハプロタイプ (A-, B7, Cw7, DR1, DQ1) が共有されていた。

れなかった。

2. 遺伝子解析

患者の父 (II-1, HLA-A11/blank) の genomic DNA の exon1 から exon4 を PCR 増幅し、クローニング後、12 個のクローンの塩基配列を調べたが、すべて A*1101 であった。

さらに患者の兄 (III-1, HLA-A31, blank) の genomic DNA を用いて以下の解析を行った。

PCR-SSP 法によるタイピングの結果、この検体は A31 ホモ接合 (A*310102/3102/3105) と判定され、その他のアレルの存在を示唆するバンドは認められなかった。PCR-SBT 法によるタイピングでも A*310102 ホモ接合と判定された。今回用いた PCR-SSP 法は *HLA-A* ローカスの exon 2 および exon 3 に 24 組のプライマーセットを用いている。PCR-SBT 法のプライマーは exon 1 および intron 4 に設定されている。これらすべてのプライマーセットで *HLA-A* 非発現型アレルが増幅されなかったことから、exon 1 から intron 4 を含む欠失が考えられた。そこで、*HLA-A* 特異的に 5'-非翻訳領域、3'-非翻訳領域に設定したプライマーで PCR 増幅を行った。陽性コントロールとして、*HLA-A* アレル既知の DNA (A*2601/A*3101) を用いた。陽性コントロール、HLA-A31/blank (III-1) の DNA とともに *HLA-A* ローカス全長に相当する約 3 kb の増幅断片のみが得られ、一部欠失により生じる短い断片は得られなかった (図 2)。この 3 kb の増幅断片をテンプレートとし、PCR-SBT 法の cycle sequencing 用プライマーを用いて exon 2 および exon 3 の塩基配列を解析したが、A*310102 以外の存在を示すシグナルは得られなかった。

パルスフィールド電気泳動による *HLA* クラス I 領域の解析では制限酵素 *Mlu* I とプローブ 59NH によって、A31 をもつハプロタイプでは 400 kb, A1, A2, A3, A11, A26 をもつハプロタイプでは 330 kb, A24 をもつハプロタイプでは 280 kb のバンドが検出される (4)。コントロールとして用いた A24 ホモ接合、A2/A31 ヘテロ接合のサンプルではハプロタイプから予想されるサイズのバンドが得られた (図 3)。A31/blank (III-1) のサンプルでは A31 を

もつハプロタイプ由来と思われる 400 kb と A2 や A11 をもつハプロタイプ由来のものより 10 kb 短い 320 kb のバンドが現れた。

考 察

家系調査により、遺伝が確認された *HLA-A* 非発現型について解析した。

今回用いた PCR-SSP 法では、1 つのアレルを exon 2-3 に設定した特異的プライマー 1 セットあるいは 2 セットの増幅により判定する。PCR-SBT 法では exon1-intron4 の領域を 1 セットの *HLA-A* ローカス特異的プライマーで PCR 増幅を行っている。今回解析した非発現型は exon 1 から intron 4 に設定した少なくとも 2 セットのプライマーで PCR 増幅されなかった。exon 1 から intron 4 を含む領域の部分欠損を疑い、5'-非翻訳領域および 3'-非翻訳領域に設定したプライマーで増幅したが部分欠失による短い増幅断片は得られなかった。さらにパルスフィールド電気泳動による解析では約 10 kb の欠失によると思われるバンドが現れた。PCR 増幅がみられない

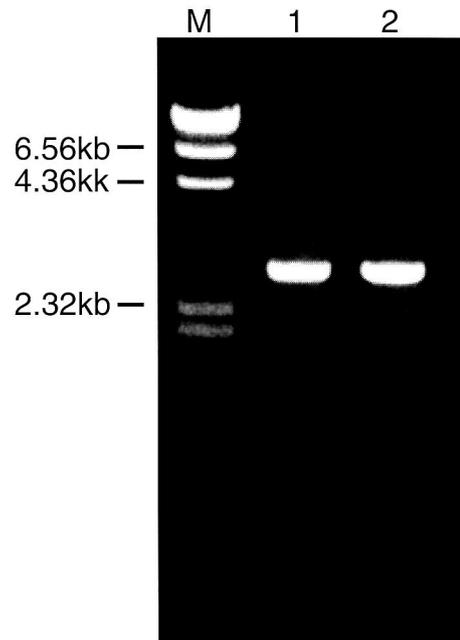


図 2 *HLA-A* 遺伝子全長の PCR 増幅

M: サイズマーカー, 1: A*2601/A*3101,
2: A31/blank

HLA-A 全長に相当する約 3 kb の増幅断片のみが得られた。

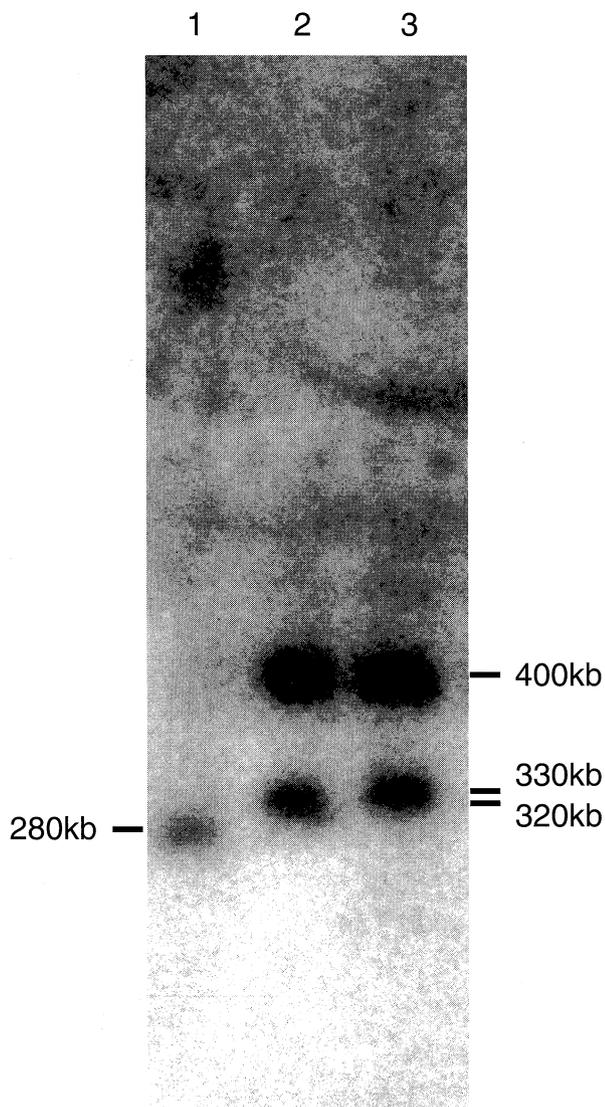


図3 パルスフィールド電気泳動法による解析
1: A24/-, 2: A31/blank (III-1), 3: A2/A31
A31/blank (III-1) では 10 kb 短い 320 kb のバンドが現れた。

原因としては欠失だけでなくプライマー設定部位の変異も否定できないため、欠失領域の確定はできないが、この HLA-A 非発現型をもつハプロタイプは HLA-A ローカスコーディング領域全域あるいは一部を含む約 10 kb が欠失していると考えられた。

HLA-A ローカスに最も近い遺伝子はセントロメア側約 30 kb に位置する HCGIX 遺伝子 (5) である。欠失は 10 kb 程度であるため、今回解析した HLA-A 非発現型をもつハプロタイプは HLA-A のみが欠失しているものと考えられた。

これまでに報告されている HLA 非発現型アリルは、1 塩基置換あるいは小規模の挿入、欠失により stop codon が形成されている。今回見つかった HLA-A の一部または全長の欠失による非発現型は極めてまれなケースである。今回のケースのように、遺伝子が広範囲に欠失している場合、血清学的タイピングと DNA によるタイピングの結果に相違を生じることはない。

新生児血小板減少症をきっかけに今回の HLA-A 非発現型が見つかったが、母児ともに非発現型は持っていないため、今回見つかった非発現型と血小板減少症の発症との間に因果関係はないと考えられる。

参考文献

1. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, et al.: Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Tissue Antigens* 60: 407–464, 2002.
2. Ishikawa Y, Tokunaga K, Tanaka H, et al.: HLA-null allele with a stop codon, HLA-A*0215N, identified in a homozygous state in a healthy adult. *Immunogenetics* 43: 1–5, 1995.
3. Geraghty, DE, Koller, BH, Pei J, et al.: Examination of four HLA class I pseudogenes: common events in the evolution of HLA genes and pseudogenes. *J. Immunol.*, 149: 1947–1956, 1992.
4. Watanabe Y, Tokunaga K, Geraghty DE, et al.: Large-scale comparative mapping of the MHC class I region of predominant haplotypes in Japanese. *Immunogenetics*, 46: 135–141, 1997.
5. Pichon L., Hampe A, Giffon T, et al.: A new non-HLA multigene family associated with the PERB11 family within the MHC class I region. *Immunogenetics* 44: 259–267, 1996.

HLA-A null haplotype by *HLA-A* deletion

Ritsuko Hayashi¹⁾, Yoshihisa Watanabe²⁾, Yoshihide Ishikawa³⁾, Kouichi Kashiwase³⁾, Masako Yamazaki¹⁾, Ikuyo Uchino¹⁾, Kimiyoshi Imura¹⁾, Kaoru Okisu¹⁾, Takayoshi Asai¹⁾, Takayoshi Komatsu⁴⁾, Katsunori Shimizu⁵⁾

- 1) Shizuoka Red Cross Blood Center
- 2) Japanese Red Cross Central Blood Center
- 3) Tokyo Red Cross Blood Center
- 4) Shizuoka Red Cross Hamamatsu Blood Center
- 5) Shimizu Children's Clinic

An HLA-A null haplotype was observed in a Japanese family by serological typing. The individual with HLA-A31/blank were typed as *HLA-A*3101* homozygote by both PCR-SSP and PCR-SBT methods. The PCR amplification of genomic DNA using an *HLA-A* locus-specific primer set designed with 3'- and 5'-untranslated regions produced only an approximately 3 kb fragment, which was expected from full length *HLA-A*. An approximately 10 kb fragment shorter than that of wild-type *HLA-A* was detected by pulse field electrophoresis analysis of Mlu I-digested DNA fragment. The nearest gene of *HLA-A*, *HCGIX*, was found to be 30 kb away from *HLA-A* on the side of the centromere. Therefore, the HLA-A null haplotype seemed to lack 10 kb including only *HLA-A*.

Keywords: HLA-A, blank, deletion, pulse field electrophoresis

● 原著論文 ●

愛媛県の 228 家系における HLA 遺伝子頻度と ハプロタイプ分布

奥山 正明, 烏谷 竜哉, 竹内 潤子, 井上 博雄

愛媛県立衛生環境研究所

(平成 15 年 12 月 25 日受付)

要約: 愛媛県に住む 228 組 680 人の HLA 家系調査により, HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1 の 4 座位の抗原・アレル頻度を分析した。血清学的検査法により A 座の 8 抗原, B 座の 23 抗原を, 遺伝子検査法により DRB1 座の 26 アレル, DQB1 座の 13 アレルを特定し, 合計 757 例の 4 座位のハプロタイプを得た。B-DRB1 の 2 座位間において B13-DRB1*1202, B37-DRB1*1001, B44-DRB1*1302, B46-DRB1*0803, B51-DRB1*1403, B52-DRB1*1502, B59-DRB1*0405, B62-DRB1*1406, B7-DRB1*0101 などは強い相関を示した。DRB1-DQB1 の 2 座位間はほぼ 1 対 1 の対応であったが, DRB1*0802, *1201, *1401 は 2 つの異なる DQB1 アレルと強い相関を示した。稀なアレルとされる DRB1*0809 は 3 家系から検出され, そのハプロタイプは A24-B60-DRB1*0809-DQB1*0402 が 2 例, A24-B54-DRB1*0809-DQB1*0402 が 1 例であった。1 例検出された DRB1*1402 のハプロタイプは, A26-B62-DRB1*1402-DQB1*0301 であった。HLA-A-B-DRB1-DQB1 のハプロタイプで頻度 2%以上を示した 6 タイプは, A24-B52-DRB1*1502-DQB1*0601(7.7%), A24-B7-DRB1*0101-DQB1*0501(3.3%), A24-B54-DRB1*0405-DQB1*0401(3.2%), A2-B46-DRB1*0803-DQB1*0601(3.0%), A33-B44-DRB1*1302-DQB1*0604/09(2.6%), A2-B61-DRB1*0901-DQB1*0303(2.5%)であった。愛媛での HLA 頻度を関東地方都市部と比較すると, A33, B44, B48, DRB1*0803, DRB1*1405, DRB1*1501, DQB1*0601, DQB1*0602 などに地域差があることが示された。

キーワード: アレル頻度, ハプロタイプ, 連鎖不平衡, 家系調査

はじめに

ヒト第 6 染色体短腕部セントロメア側に位置する主要組織適合性抗原複合体(以下 HLA という。)領域の各遺伝子座は, ヒト遺伝子の中で最も多型性に富みアレル数が多い。その主な構成要因である A 座は 28 抗原 250 アレル, B 座は 59 抗原 490 アレル, DRB1 座は 21 抗原 315 アレルが 2002 年に WHO 命

名委員会で公認されている(1)。血清学的検査方法を用いた HLA 抗原の新たな検出はもはや限界に近いが, 遺伝子検査の普及による遺伝子レベルでの検索ではアレル数が今もなお増加し続けている。

HLA の各抗原・アレルは人種や民族によってその頻度が異なっている(2)。さらに, 同一染色体上に近隣する複数の遺伝子座の組み合わせであるハプロ

著者連絡先 〒790-0003 愛媛県松山市三番町 8-234
愛媛県立衛生環境研究所
奥山 正明

電話 089-931-8757
F A X 089-947-1262
E-mail okuyama-masaaki@pref.ehime.jp

タイプの頻度は、ハプロタイプを構成する各抗原・アレルの頻度から推定される理論値と異なることが知られている。この連鎖不平衡によるハプロタイプ頻度はいろいろな人種や民族により異なり、特徴的なハプロタイプが人種や民族によってよく保存されている(2)。

日本人集団を対象とした HLA の各抗原・アレルやハプロタイプ頻度は、第 11 回日本 HLA ワークショップ共同報告(以下 11JWS という。)(3)をはじめいくつか報告されている(4-7)。しかしながら、愛媛県住民を対象とした家系調査による検索結果は、それらの報告にはない稀なアレルとされる DRB1*0809 が検出され、そのハプロタイプも特定された。また、HLA 頻度も他の報告と比較すると地域差がみられた。そこで、これらの検索結果を日本の一地方における HLA 抗原・アレル及びそのハプロタイプ頻度として集計・分析した。

材料と方法

1 分析対象

1992 年 4 月から 2002 年 6 月の間に、本人の委託あるいは同意を得て HLA 診断のみを行った愛媛県に住む家族のうち、HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1 の 4 座位のハプロタイプが特定できた 228 家系 680 人を対象とした。対象データは連結不能匿名化の後に解析を行い、解析データの健康事象との関連付けは行っていない。ハプロタイプは血縁間における重複を除き、合計 757 例を得た。

2 HLA 検査方法

A, B および Cw 座の抗原は T リンパ球の HLA 抗原に対する特異的な抗血清を用いたリンパ球細胞障害試験により決定した(8)。HLA 抗血清は自家製および市販品を用い、11JWS で報告された抗原が B49, B5103 を除き検出可能であった。ただし、集計は B22N を B56, B5102 を B51 とした。DRB1 および DQB1 座のアレルは血液中の有核細胞から SDS と Proteinase K 処理、エタノール沈殿により抽出したゲノム DNA をグループ特異的プライマーで増幅した後に、制限酵素切断パターンの組み合わせによって判定する方法 (PCR-RFLP 法)を用い 4 ケ

タレベルのアレルを決定した(9-12)。この方法により 1996 年 WHO 命名委員会(13)で公認されたアレルの識別が DRB1*1501/03, DQB1*0201/02, DQB1*0604/09 を除き可能であった。ただし、DRB1*1501/03 については日本人集団の既報告(3-7)に DRB1*1503 の報告がないことから DRB1*1501 と記述し、DQB1*0604/09 はそのまま記述した。また、DQB1*02 は *0201/02 と *0203 の判別を行い、DRB1*07 は *0701, *0703, *0704 の判別を行った。

3 連鎖不平衡の分析

連鎖不平衡値 (linkage disequilibrium, LD 値)、相対連鎖不平衡値 (relative linkage disequilibrium, RLD 値)および 2 座の抗原・アレル間における頻度の有意差検定は Imanishi らの方法(14)に従った。

結果

1 HLA 抗原およびアレル頻度

A 座の 9 抗原, B 座の 23 抗原, DRB1 座の 26 アレル, DQB1 座の 13 アレルが 228 家系から検出された(表 1)。Cw 座については 31.4% が未確定抗原であったため解析から除外した。11JWS で 0.1% 以下の低頻度として報告されている B14, B49, DRB1*0301, DRB1*0302, DRB1*1102, DRB1*1103, DRB1*1304, DRB1*1307, DRB1*1601, DQB1*0504 などは検出されなかった。また、0.1% 以上の頻度とされる A30, DRB1*0404, DRB1*0408, DRB1*0804, DRB1*1407, DQB1*0605 なども検出されなかった。一方、稀なアレルの DRB1*0809 と *1402 がそれぞれ 0.4%, 0.1% で検出された。

愛媛の HLA 頻度と関東地方都市部を調べた中島らの報告(7)とについて母比率の差の検定を行うと、DRB1*0803, DQB1*0601 は愛媛に高く、A33, B44, B48, DRB1*1405, DRB1*1501, DQB1*0602 は愛媛が低く、地域における頻度差が有意水準 5% 以下で認められた(表 2)。

2 2 座位間のハプロタイプ頻度、連鎖不平衡

228 家系から得られたハプロタイプについて 2 座

表1 HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1 の各抗原・アレルの頻度

A 頻度(%)	B 頻度(%)	DRB1 頻度(%)	DQB1 頻度(%)
1 0.53	13 2.11	0101 5.28	0201/02 0.26
2 26.82	17 0.40	0401 0.79	0301 12.15
3 0.40	27 0.26	0403 2.38	0302 9.25
11 10.43	35 8.32	0405 14.00	0303 15.72
24 36.33	37 0.92	0406 3.96	0401 13.34
26 11.89	38 0.26	0407 0.66	0402 5.68
31 9.25	39 4.36	0410 1.72	0501 5.94
33 4.36	44 4.49	0701 0.40	0502 2.51
	46 5.55	0802 5.15	0503 3.57
	48 2.25	0803 12.15	0601 21.66
	51 9.51	0809 0.40	0602 6.08
	52 11.10	0901 14.53	0603 0.40
	54 7.93	1001 0.66	0604/09 3.43
	55 3.30	1101 2.91	
	56 0.79	1201 3.17	
	59 1.72	1202 2.25	
	60 6.34	1301 0.40	
	61 12.55	1302 3.43	
	62 9.11	1401 4.49	
	67 0.53	1402 0.13	
	7 5.15	1403 1.98	
	70 1.85	1405 1.19	
	75 1.19	1406 1.32	
		1501 6.47	
		1502 9.78	
		1602 0.40	

DQB1*0201/02, 0604/09 は区別されていない。

表2 頻度に地域差のみられた抗原・アレル

抗原・アレル	愛媛	関東都市部 [#]	p-value
A33	0.0436	0.0784	0.0087
B44	0.0449	0.0707	0.0474
B48	0.0225	0.0554	0.0019
DRB1*0803	0.1215	0.0640	0.0007
DRB1*1405	0.0119	0.0310	0.0159
DRB1*1501	0.0647	0.1163	0.0012
DQB1*0601	0.2166	0.1492	0.0026
DQB1*0602	0.0608	0.1163	0.0004

[#] 文献7より引用

位間のハプロタイプ頻度, 相対連鎖不平衡値, χ^2 検定値を求め, 有意水準 0.1% 以下で正の相関を示すものについて, A-B 座を表3, B-DRB1 座を表4, DRB1-DQB1 座を表5にまとめた。

A-B 座間は, A1 は B37 と, B38 は A2 とだけに連鎖がみられ, A33-B44, A24-B52 は高い相関を示した。

B-DRB1 座間は, DRB1*1001 は B37 とだけに連鎖がみられた。頻度 1% 以上で RLD 値が高いものは, B13-DRB1*1202, B44-DRB1*1302, B46-

表3 A-B 2 座位のハプロタイプ頻度, 相対連鎖不平衡値, χ^2 値

A	B	HF	RLD	χ^2
1	37	0.005	1.00	861.7
2	13	0.012	0.40	14.4
2	38	0.003	1.00	11.0
2	46	0.040	0.61	90.2
2	55	0.016	0.29	11.8
3	13	0.001	0.32	28.4
11	39	0.020	0.39	90.5
11	54	0.017	0.13	17.6
11	62	0.024	0.17	39.8
11	67	0.003	0.44	13.5
24	48	0.015	0.44	12.1
24	52	0.090	0.70	162.7
24	54	0.041	0.24	13.3
24	7	0.037	0.56	44.7
26	35	0.020	0.14	18.6
26	61	0.029	0.13	26.3
26	62	0.028	0.21	49.9
31	51	0.034	0.31	136.9
33	44	0.038	0.87	1118.6

HF = haplotype frequency

RLD = relative linkage disequilibrium value

χ^2 値は $p < 0.001$ を表示

DRB1*0803, B51-DRB1*1403, B52-DRB1*1502, B59-DRB1*0405, B62-DRB1*1406, B7-DRB1*0101 などがあった。稀なアレルの DRB1*0809 は B54 あるいは B60 と, DRB1*1402 は B62 と連鎖していた。

DRB1-DQB1 座間の RLD 値は A-B 間, B-DRB1 間に比べかなり高く, その多くが 1 対 1 の相関になっていたが, DRB1*0405-DQB1*0402 ($n=5$), DRB1*0701-DQB1*0303 ($n=1$), DRB1*0803-DQB1*0301 ($n=2$), DRB1*0901-DQB1*0301 ($n=2$), DRB1*1501-DQB1*0301 ($n=3$) などの少数ハプロタイプもみられた。DRB1*0809 は DQB1*0402 と連鎖していた。DRB1 の 1 アレルに DQB1 の 2 アレルの相関があり頻度の高いものは, DRB1*0802 の DQB1*0302 と *0402, DRB1*1201 の DQB1*0301 と *0303, DRB1*1401 の DQB1*0502 と *0503 であった。

表 4 B-DRB1 2 座位のハプロタイプ頻度, 相対連鎖不平衡値, χ^2 値

B	DRB1	HF	RLD	χ^2
13	0701	0.001	0.32	28.4
13	1202	0.018	0.87	1082.4
17	1201	0.001	0.31	17.9
17	1302	0.003	0.65	72.6
27	1101	0.001	0.49	31.5
35	0410	0.008	0.41	49.6
37	1001	0.007	1.00	1078.6
38	0410	0.001	0.49	55.4
39	0803	0.020	0.38	71.7
44	1301	0.001	0.30	11.7
44	1302	0.029	0.84	805.9
46	0803	0.044	0.76	367.5
48	0401	0.003	0.32	53.3
48	0407	0.003	0.39	65.4
48	1602	0.003	0.66	113.9
51	0802	0.011	0.12	11.6
51	1101	0.008	0.20	16.6
51	1201	0.008	0.17	13.8
51	1401	0.012	0.19	23.8
51	1403	0.015	0.71	144.9
52	1502	0.090	0.91	1085.4
54	0405	0.048	0.53	229.0
55	0405	0.015	0.35	38.6
55	0410	0.004	0.20	32.4
56	1401	0.003	0.30	23.5
59	0405	0.016	0.91	134.7
60	0405	0.021	0.22	31.8
60	0809	0.003	0.64	36.9
61	0802	0.015	0.18	18.4
61	0901	0.059	0.38	188.6
62	0406	0.026	0.63	249.8
62	1402	0.001	1.00	20.0
62	1406	0.012	0.89	162.7
67	0410	0.001	0.24	25.8
67	1501	0.003	0.47	25.2
67	1602	0.001	0.33	123.3
7	0101	0.044	0.82	1034.1
70	0401	0.003	0.32	66.1
70	0802	0.005	0.25	32.0
70	1101	0.003	0.11	13.1
70	1405	0.003	0.21	41.7
75	0403	0.003	0.20	30.9
75	0901	0.007	0.48	24.7

HF = haplotype frequency
 RLD = relative linkage disequilibrium value
 χ^2 値は p<0.001 を表示

3 多座位間のハプロタイプ頻度, 連鎖不平衡
 0.5% 以上の頻度を示す多座位間のハプロタイプ
 は, A-B-DRB1 の 3 座位で 38 タイプ(表 6), B-

表 5 DRB1-DQB1 2 座位のハプロタイプ頻度, 相対連鎖不平衡値, χ^2 値

DRB1	DQB1	HF	RLD	χ^2
0101	0501	0.053	1.00	1336.4
0401	0301	0.008	1.00	87.4
0403	0302	0.024	1.00	361.9
0405	0401	0.133	1.00	1431.6
0406	0302	0.040	1.00	613.2
0407	0302	0.007	1.00	98.8
0410	0402	0.017	1.00	439.3
0701	0201/02	0.003	1.00	1008
0802	0302	0.022	0.38	115.6
0802	0402	0.029	0.54	395.0
0803	0601	0.119	0.97	715.9
0809	0402	0.004	1.00	100.0
0901	0303	0.143	0.98	1321.1
1001	0501	0.007	1.00	159.3
1101	0301	0.029	1.00	327.6
1201	0301	0.018	0.53	99.0
1201	0303	0.013	0.31	25.2
1202	0301	0.022	1.00	251.4
1301	0603	0.004	1.00	1514.0
1302	0604/09	0.034	1.00	1514.0
1401	0502	0.021	0.83	577.5
1401	0503	0.024	0.65	504.6
1402	0301	0.001	1.00	14.5
1403	0301	0.020	1.00	221.2
1405	0503	0.012	1.00	492.5
1406	0301	0.013	1.00	146.5
1501	0602	0.061	1.00	1415.3
1502	0601	0.098	1.00	593.1
1602	0502	0.004	1.00	234.0

HF = haplotype frequency
 RLD = relative linkage disequilibrium value
 χ^2 値は p < 0.001 を表示
 DQB1*0201/02, *0604/09 は区別されていない。

DRB1-DQB1 の 3 座位で 50 タイプ(表 7), A-B-DRB1-DQB1 の 4 座位で 35 タイプ(表 8) が検出された。

A-B-DRB1 の頻度 1% 以上を示すものは 14 タイプであったが, 757 例中 251 例 (33.2%) を占めていた。同様に B-DRB1-DQB1 は 20 タイプで 50.3% (381/757), A-B-DRB1-DQB1 は 14 タイプで 32.9% (249/757) を占めていた。

DRB1*0809 のハプロタイプは, A24-B60-DRB1*0809-DQB1*0402 (n=2), A24-B54-DRB1*0809-DQB1*0402 (n=1) であり, DRB1*1402 は, A26-B62-DRB1*1402-DQB1*0301 (n=1) で

表6 A-B-DRB1 3座位のハプロタイプ頻度, 連鎖不平衡値, 相対連鎖不平衡値

A	B	DRB1	HF	LD	RLD
24	52	1502	0.077	0.073	0.77
24	7	0101	0.033	0.032	0.63
2	46	0803	0.032	0.030	0.56
24	54	0405	0.032	0.028	0.37
33	44	1302	0.026	0.026	0.77
2	61	0901	0.025	0.020	0.17
26	61	0901	0.018	0.016	0.14
11	62	0406	0.017	0.017	0.43
11	39	0803	0.015	0.014	0.32
24	60	0405	0.013	0.010	0.17
24	61	0901	0.012	0.005	0.04
2	13	1202	0.011	0.010	0.50
26	62	1406	0.011	0.010	0.80
24	46	0803	0.011	0.008	0.15
33	44	0803	0.009	0.009	0.21
31	51	0802	0.009	0.009	0.17
11	54	0405	0.009	0.008	0.10
31	51	1401	0.008	0.008	0.17
2	7	0101	0.007	0.006	0.12
2	35	1501	0.007	0.005	0.08
1	37	1001	0.005	0.005	1.00
11	13	1202	0.005	0.005	0.25
31	51	1403	0.005	0.005	0.26
2	70	0802	0.005	0.005	0.28
11	55	0405	0.005	0.005	0.15
2	51	0403	0.005	0.005	0.20
2	59	0405	0.005	0.005	0.28
26	61	0802	0.005	0.005	0.09
24	59	0405	0.005	0.004	0.27
24	51	1101	0.005	0.004	0.15
31	35	0901	0.005	0.004	0.05
24	62	0406	0.005	0.004	0.10
24	55	0405	0.005	0.004	0.11
2	60	0405	0.005	0.003	0.05
2	52	1502	0.005	0.002	0.03
2	51	0901	0.005	0.002	0.02
24	62	0901	0.005	0.000	0.01
24	52	0405	0.005	-0.000	-0.00

HF = haplotype frequency (HF \geq 0.5% を表示)

LD = linkage disequilibrium value

RLD = relative linkage disequilibrium value

あった。

考察

家系調査による愛媛県での各抗原・アレルの頻度は、日本人集団を対象とした研究報告(3-7)とほぼ同様な傾向の数値を示したが、それらの報告にはない DRB1*0809 が 228 家系中 3 家系 (1.3%), 757 ハプロタイプ中 3 例 (0.4%) から検出された。

表7 B-DRB1-DQB1 3座位のハプロタイプ頻度, 連鎖不平衡値, 相対連鎖不平衡値

B	DRB1	DQB1	HF	LD	RLD
52	1502	0601	0.090	0.087	0.92
61	0901	0303	0.059	0.057	0.46
54	0405	0401	0.048	0.046	0.59
7	0101	0501	0.044	0.043	0.85
46	0803	0601	0.042	0.041	0.76
44	1302	0604/09	0.029	0.021	0.85
62	0406	0302	0.026	0.026	0.66
39	0803	0601	0.020	0.019	0.44
60	0405	0401	0.020	0.018	0.24
13	1202	0301	0.018	0.018	0.87
35	0901	0303	0.016	0.014	0.17
51	1403	0301	0.015	0.014	0.73
59	0405	0401	0.015	0.014	0.84
55	0405	0401	0.015	0.014	0.43
62	1406	0301	0.012	0.012	0.90
54	0803	0601	0.012	0.010	0.13
51	0802	0402	0.011	0.010	0.20
60	0901	0303	0.011	0.009	0.15
62	0901	0303	0.011	0.008	0.10
51	0901	0303	0.011	0.008	0.09
35	1501	0602	0.009	0.009	0.15
51	1501	0602	0.009	0.009	0.15
61	1501	0602	0.009	0.009	0.15
61	0802	0302	0.009	0.009	0.17
44	0803	0601	0.009	0.008	0.18
35	0410	0402	0.008	0.008	0.46
51	1101	0301	0.008	0.008	0.26
62	1501	0602	0.008	0.008	0.13
35	0405	0401	0.008	0.006	0.08
51	1401	0502	0.007	0.006	0.26
39	1501	0602	0.007	0.006	0.15
75	0901	0303	0.007	0.006	0.55
51	1201	0303	0.007	0.006	0.20
62	0803	0601	0.007	0.004	0.05
51	0803	0601	0.007	0.004	0.04
37	1001	0501	0.005	0.005	0.80
61	1401	0502	0.005	0.005	0.21
51	1401	0503	0.005	0.005	0.14
35	0403	0302	0.005	0.005	0.22
51	0403	0302	0.005	0.005	0.22
60	1101	0301	0.005	0.005	0.18
61	0403	0302	0.005	0.005	0.21
54	1501	0602	0.005	0.005	0.08
61	0802	0402	0.005	0.005	0.10
35	0802	0302	0.005	0.005	0.10
51	0405	0401	0.005	0.004	0.04
54	0901	0303	0.005	0.003	0.04
52	0405	0401	0.005	0.003	0.03
35	0803	0601	0.005	0.003	0.04
52	0901	0303	0.005	0.003	0.03

HF = haplotype frequency (HF \geq 0.5% を表示)

LD = linkage disequilibrium value

RLD = relative linkage disequilibrium value

DQB1*0604/09 は区別されていない。

表 8 A-B-DRB1-DQB1 4 位のハプロタイプ頻度, 連鎖不平衡値, 相対連鎖不平衡値

A	B	DRB1	DQB1	HF	LD	RLD
24	52	1502	0601	0.077	0.076	0.78
24	7	0101	0501	0.033	0.033	0.64
24	54	0405	0401	0.032	0.031	0.40
2	46	0803	0601	0.030	0.030	0.54
33	44	1302	0604/09	0.026	0.026	0.77
2	61	0901	0303	0.025	0.024	0.19
26	61	0901	0303	0.018	0.018	0.15
11	62	0406	0302	0.017	0.017	0.43
11	39	0803	0601	0.015	0.014	0.33
24	60	0405	0401	0.012	0.011	0.18
24	61	0901	0303	0.012	0.011	0.08
26	62	1406	0301	0.011	0.011	0.80
2	13	1202	0301	0.011	0.011	0.50
24	46	0803	0601	0.011	0.010	0.18
31	51	0802	0402	0.009	0.009	0.18
33	44	0803	0601	0.009	0.009	0.21
11	54	0405	0401	0.009	0.009	0.11
2	7	0101	0501	0.007	0.007	0.13
2	35	0901	0303	0.007	0.006	0.07
11	13	1202	0301	0.005	0.005	0.25
31	51	1403	0301	0.005	0.005	0.27
2	51	0403	0302	0.005	0.005	0.22
11	55	0405	0401	0.005	0.005	0.16
26	61	0802	0302	0.005	0.005	0.10
2	59	0405	0401	0.005	0.005	0.30
2	35	1501	0602	0.005	0.005	0.09
24	59	0405	0401	0.005	0.005	0.30
24	51	1101	0301	0.005	0.005	0.18
24	62	0406	0302	0.005	0.005	0.13
31	35	0901	0303	0.005	0.005	0.06
24	55	0405	0401	0.005	0.005	0.15
2	60	0405	0401	0.005	0.005	0.08
2	51	0901	0303	0.005	0.005	0.05
2	52	1502	0601	0.005	0.005	0.05
24	62	0901	0303	0.005	0.005	0.05

HF = haplotype frequency (HF \geq 0.5% を表示)

LD = linkage disequilibrium value

RLD = relative linkage disequilibrium value

DQB1*0604/09 は区別されていない。

DRB1*0809 は, 1995 年に報告された塩基配列 (15) が公認されたものであるが, その後の日本人集団を調査した研究報告 (5-7) においても記載されておらず, 遺伝子頻度や連鎖する各遺伝子座の抗原・アレルも明確でない。高い相同性を示す DRB1*0809 と DRB1*0802 の判別は, 両アレルに共通なプライマーで増幅後, 制限酵素 RsaI の切断パターンにより区別することが可能である。

今回家計調査で確定された DRB1*0809 の 3 例のハプロタイプは, Cw 抗原も含めると, A24-Cw4-

B60-DRB1*0809-DQB1*0402, A24-Cw7-B60-DRB1*0809-DQB1*0402, A24-Cw1-B54-DRB1*0809-DQB1*0402 であった。DRB1*0809 と DRB1*0802 の両アレルの連鎖関係を比較すると, 両アレルとも DQB1*0402 と強い相関が認められたが, B 座については DRB1*0802 が B51 あるいは B61 と強い連鎖を示しているのに対し, DRB1*0809 は B54 あるいは B60 であった。

DRB1*0809 の各人種・民族のアレル頻度については世界的にも稀なアレルと考えられるが, 最近の研究報告の中では台湾 (16) に 0.7% と報告があることから東アジアだけに特有なものであるのかもしれない。台湾での調査報告も DRB1*0809 のハプロタイプの記述はない。

DRB1*1402 も稀なアレルとされるが, このハプロタイプは 757 ハプロタイプ中 1 例 (0.13%) から検出され, A26-Cw9-B62-DRB1*1402-DQB1*0301 であった。日本人集団の研究報告 (4-7) の中には Hashimoto ら (4) が 0.05% のアレル頻度と報告している。外国での調査報告は, いずれも DQB1*0301 と連鎖していた (17-20)。しかし, それらはクラス I 領域との関連は調べられていない。

A-B-DRB1-DQB1 の 4 座位で頻度 2% 以上のハプロタイプは, A24-B52-DRB1*1502-DQB1*0601, A24-B7-DRB1*0101-DQB1*0501, A24-B54-DRB1*0405-DQB1*0401, A2-B46-DRB1*0803-DQB1*0601, A33-B44RB1*1302-DQB1*0604, A2-B61-DRB1*0901-DQB1*0303 の 6 タイプであったが, これらは日本人集団における代表的なものであり (3), これらの占める割合は 757 ハプロタイプ中 169 例 (22.3%) であった。

今回検出されなかった A30, B14, DRB1*0404, DRB1*1407 は, 家系調査以外の検索においてそれぞれ 3 例, 1 例, 2 例, 1 例検出されていることから, 当所の検査レベルで検出不可能な抗原・アレルではないといえる。同様に, DRB1*0301 などの家系調査以外の検索でも検出されなかったアレルについても自家製 PCR-RFLP 法で検索可能なものである。B49 については, この抗原に対する特異的抗血清を当所では使用しておらず検出不可能であった。B49 は, 11JWS では頻度 0.04% の記載があるもの

の、その他では血清学的検査を行った報告(4,5)のみならずDNA検査を行った報告(6,7)にも記載されておらず、非常に稀な抗原であるといえる。

HLA頻度は国内においても均一ではなく差異があることが考えられるが、愛媛での結果を関東地方の都市部の報告(7)と比較すると、A33, B44, B48, DRB1*0803, DRB1*1405, DRB1*1501, DQB1*0601, DQB1*0602などの頻度に地域差があることが示された。

HLAの各抗原・アレルの頻度及びそれらのハプロタイプは人種・民族により異なっていることから人種・民族の特徴を示す有効な指標の一つと考えられ、人種・民族の系統樹の作製(21)や、民族移動の推測(22)にも利用されている。HLA頻度に関する研究報告は、日本人を集約した対象の報告に加え、全国から人が集まる都市部とは異なる地域住民だけを対象とした本報告のような調査報告が増えてくるならば、他の地域との比較においてHLA頻度の差異が明確に示されることが予測され、地域どうしのつながりなどの特性が示されるかもしれない。そして、移植医療などの基礎データとして有効に活用できるものと考えられる。

文献

1. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, *et al.*: Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Tissue Antigens* 60(5): 236–283, 2002.
2. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, *et al.*: Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. *HLA 1991, Vol 1* (eds. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), Oxford University Press, p. 1065–1220, 1992.
3. Akaza T, Imanishi T, Fujiwara K, *et al.*: HLA alleles and haplotypes of Japanese population. *MHC & IRS 1* (suppl): 219–226, 1994.
4. Hashimoto M, Kinoshita T, Yamasaki M, *et al.*: Gene frequencies and haplotypic associations within the HLA region in 916 unrelated Japanese individuals. *Tissue Antigens* 44(3): 166–173, 1994.
5. 前田平生, 平田蘭子, 徳永勝士: HLA-DNA タイピングと日本人の HLA, 移植, 34: 55–64, 1999.
6. Saito S, Ota S, Yamada E, *et al.*: Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class 1 and class 2 loci in the Japanese population. *Tissue Antigens* 56(6): 522–529, 2000.
7. 中島文明, 中村淳子, 横田敏和: 日本人の4桁レベルのHLAハプロタイプ分布, *MHC*, 8: 1–32, 2001.
8. 佐藤薫: 死体腎移植検査のHLA検査の実際, 今日移植, 1: 83–87, 1988.
9. Nomura N, Ota M, Tuji K, *et al.*: HLA-DQB1 genotyping by a modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* 38(2): 53–59, 1991.
10. Ota M, Seki T, Fukushima H, *et al.*: HLA-DRB1 genotyping by a modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* 39(4): 187–202, 1992.
11. Karasudani T, Okuyama M, Sakamoto H, *et al.*: HLA class 2 DNA typing by PCR-RFLP method. *MHC & IRS 1* (suppl): 98–101, 1994.
12. 烏谷竜哉, 竹内潤子, 奥山正明: PCR-RFLP法の解析, *MHC*, 9: 205–209, 2003.
13. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, *et al.*: Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tissue Antigens* 49(3): 297–321, 1997.
14. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, *et al.*: Estimation of allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci. *HLA 1991, Vol 1* (eds. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), Oxford University Press, p. 76–79, 1992.
15. Kashiwase K, Tokunaga K, Lin L, *et al.*: A new HLA-DR8 subtype showing unusual serological reaction and the confirmatory sequence of DRB1*0809. *Tissue Antigens* 46(4): 340–342, 1995.
16. Huang SM, Wu TJ, Lee TD, *et al.*: The association of HLA-A, -B, and -DRB1 genotypes with Graves' disease in Taiwanese people. *Tissue Antigens* 61(2): 154–158, 2003.

17. Mack SJ, Bugawan TL, Moonsamy PV, *et al.*: Evolution of Pacific/Asian population inferred from HLA class II allele frequency distributions. *Tissue Antigens* 55(5): 383–400, 2000.
18. Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcon G, Granados J, *et al.*: HLA genes in Mexican Mezatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* 56(5): 405–416, 2000.
19. Aleaz C, Infante E, Pujol J, *et al.*: Molecular analysis of HLA-DRB1, DQA1, DQB1, DQ promoter polymorphism and extended class I/class II haplotypes in the Seri Indians from Northwest Mexico. *Tissue Antigens* 59(5): 388–396, 2002.
20. Song EY, Park MH, Kang SJ, *et al.*: HLA class II allele and haplotype frequencies in Koreans based on 107 families. *Tissue Antigens* 59(6): 475–486, 2002.
21. Imanishi T, Wakisaka A, Gojobori T: Genetic relationship among various human populations indicated by MHC polymorphism. *HLA 1991, Vol 1* (eds. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), Oxford University Press, p. 627–632, 1992.
22. Arnaiz-Villena, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, *et al.*: Population genetic relationships between Mediterranean populations determined by HLA allele distribution and a historic perspective. *Tissue Antigens* 60(2): 111–121, 2002.

HLA genes and haplotype frequencies based on 228 families in Ehime Prefecture, Japan

Masaaki Okuyama, Tatsuya Karasudani, Junko Takeuchi, Hiroo Inouye

Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Ehime, Japan

Summary: We have investigated the distribution of HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1 genes and haplotypes in 228 families with a total of 680 members living in Ehime Prefecture, Japan. HLA-A and -B antigens were typed by standard microlymphocytotoxicity assay, and high resolution typing of HLA-DRB1 and -DQB1 alleles were performed by PCR-RFLP method. A total of 8 HLA-A antigens, 23 HLA-B antigens, 26 HLA-DRB1 alleles and 13 HLA-DQB1 alleles, including two rare alleles, were detected. The rare alleles were HLA-DRB1*0809 and DRB1*1402. Most of HLA-DRB1 alleles were strongly associated with single HLA-DQB1 alleles. In contrast, DRB1*0802, *1201 and *1401 were associated with two different DQB1 alleles. The frequencies of HLA-DRB1*0803 ($p < 0.001$), and -DQB1*0601 ($p < 0.01$) were significantly increased in our family sample, whereas the frequencies of HLA-A33 ($p < 0.01$), -B44 ($p < 0.05$), -B48 ($p < 0.01$), -DRB1*1405 ($p < 0.05$), -DRB1*1501 ($p < 0.01$) and DQB1*0602 ($p < 0.001$) were decreased, when compared to the population living in the Kanto area, Japan. The six most common HLA-A-B-DRB1-DQB1 haplotypes of frequencies $> 2\%$ were HLA-A24-B52-DRB1*1502-DQB1*0601 (7.7%), HLA-A24-B7-DRB1*0101-DQB1*0501 (3.3%), HLA-A24-B54-DRB1*0405-DQB1*0401 (3.2%), HLA-A2-B46-DRB1*0803-DQB1*0601 (3.0%), HLA-A33-B44-DRB1*1302-DQB1*0604/09 (2.6%), and HLA-A2-B61-DRB1*0901-DQB1*0303 (2.5%). It was shown that the HLA-A-B-DRB1-DQB1 haplotypes of DRB1*0809 and *1402 were A24-B62-DRB1*0809-DQB1*0402 ($n = 2$), A24-B54-DRB1*0809-DQB1*0402 ($n = 1$) and A26-B62-DRB1*1402-DQB1*0301 ($n = 1$).

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認

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			
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 + SSCP + RFLP	SSOP + SSCP + RFLP	SSP + SSOP + SSCP + SBT
	10	2	2	2	2	2	1	1
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
	4桁レベル正解数	4 ^{##}	1 [#]	1 [#]	0 [#]	1 [#]	0 [#]	1
Group 2 (2) 濾紙DNA H1505R:1502/- H1506R: 0803/1502	Low (middle) 正解数	8 ^{##}	2	2	2	2	1	1
	4桁レベル正解数	3 ^{##}	2	1 [#]	1 [#]	1 [#]	0 [#]	1

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 Pel, 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		19	17	1
Group 1 (3) DNA 溶液 H1501R: B3*0101, B5*0101, H1502R: B3*0301, B4*01, H1503R: B5*0102,-	Low (middle) 正解数	15 ^{###}	15 [*]	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	7 ^{###}	17	not tested
	4桁 レベル 正 解数	0 [*]	3 [#]	not tested
HLA-DRB3/4/5 Multi Method		SSP + SSCP 自家製	SSP + SSOP Dynal, One Lambda RELI	SSP + SSOP+SS CP+ RFLP One Lambda, RELI, 自家 製
施設数		1	3	1
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 sic	SSOP + SSCP INNO-LIPA 自家製	RFLP+S SCP+S BT
施設数		2	1	1	1
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
HLA-DQA1 Method		RFLP 自家製			
施設数		3			
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H1503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。

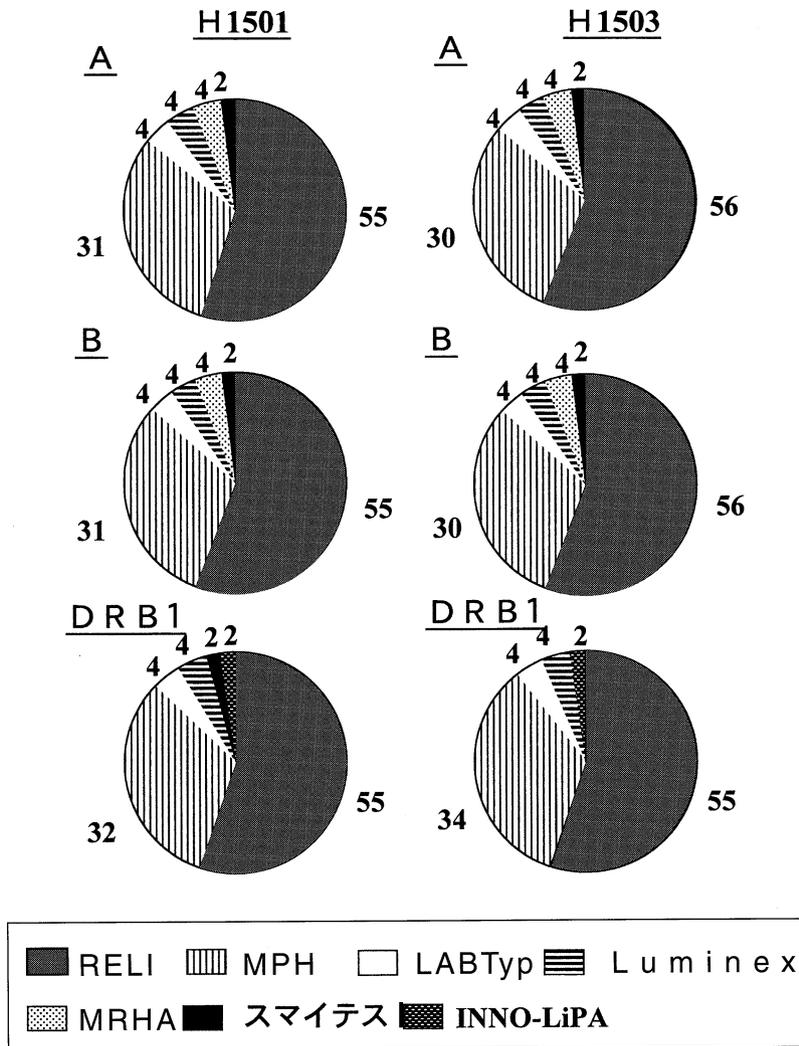


図1 SSO 市販キットの使用率 (%)

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			
スライスト (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			
スライスト (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			
スライスト (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			
スライスト (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
計 (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
計 (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*0303-11/12-13	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	→											*0201/02/03/+	*2601/02/04/+	*0801/+	*1501/+	*0701	*0303
068	Blood Center	04A	6	6	8	8	8	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	B	C	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Laboratory	Lot #	2	9	26	28	29	31	34	35	56	66	76	78	82	90	13	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	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	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	1	*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	1	*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	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	6	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	6	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	nt	→											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	6	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	E	D	G	F	E	D	B	A	B	HLA-A		HLA-B		HLA-C			
012	Hospital #04A	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	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	*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	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	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	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	*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		DQB1	
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	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	D	H	D	E	DRB1		DRB3/4/5		DQB1	
006	Company	018	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	*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						

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		DQB1	
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6 OneLambda 社製 MicroSSP JPN を使用したサンプル H1502/R の DRB1 反応パターン

パターン	Common Japanese Alleles	Other Alleles	10 G	10 D	10 C	12 H
A	DRB1*040101-0102/0301/04/0701	DRB1*0402/0702-08/13-14/22-23/ 27/32-35/37-39/42-44				
B	DRB1*040501-0502/06/09-11/28-30	DRB1*040302/0503-0504/15-17/ 19-21/24/26/40-41				
C	DRB1*130101/0201/0702	DRB1*130102-0103/0202-06/08-10/ 12-13/1402-16/18-19/21/26/28/30-36/ 38-40/42/45-46/48-53/55; DRB1*1416/25/37				
D	DRB1*130701	DRB1*0820;DRB1*1311/1401/22- 23/37/47				

サンプルH1502/Rが示す反応	10 G	10 D	10 C	12 H
パターンAとCの組合せで示す反応				
パターンAとDの組合せで示す反応				
パターンBとCの組合せで示す反応				
パターンBとDの組合せで示す反応				

パターンAとパターンBの区別は不可能であるが、パターンBの場合パターンCとパターンDの区別は可能である。
サンプルH1502/Rの場合、パターンAとパターンBおよびパターンCとパターンDの区別は不可能である。

表7 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Iアリル)

Kit: OneLambda MicroSSP JPN DNA Sample: H1503/R		1 G	2 D	3 C	4 A	4 H	4 A	5 F	7 C	7 A	7 F	7 C	9 G	9 F	9 C	Local Assignment					
Laboratory	Lot #	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
008 University	#002	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/+	2402/03/+	4601	5201	0102/03	1202/03/+
015 Hospital	#002	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2402/03/04/+	4601	5201	0102/03	1202/03/04/+
003 Hospital	#003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2402/03/04/+	4601/02	5201	0102/03/04/+	12/14
031 Hospital	#003	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6						
052 Blood Center	#003	8	6	6	8	6	6	8	8	6	8	8	8	8	8	A*02	A*24	B*46	B*52	Cw*01	Cw*12
064 Blood Center	#003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*0201/02/03/+	*2402/03/04/+	*4601/02	*5201	*0102/03/04/+	*1202/03/04/+
067 Blood Center	#003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2402/03/04/+	4601/02	5201	0102/03/05/+	1202/03/04/+
018 Typing Lab	#003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2402/02/03/+	4601/02	5201	0102/03/05	1202/08

Ave. 7.8 7.5 7.3 7.3 7.8 7.5 6.8 7.8 7.5 7.5 7.0 7.5 7.8 7.3 7.5

Kit: OneLambda MicroSSP AB/DR DNA Sample: H1503/R		1 E	1 B	1 A	4 H	4 G	4 E	4 D	5 A	7 C	7 A	9 C	9 A	10 H	Local Assignment			
Laboratory	Lot #	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	HLA-A		HLA-B	
016 Hospital	#04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	A*02	A*24	B*46	B*52
021 Hospital	#04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*02	*24	*4601/02	*5201
038 Hospital	#04A	6	8	8	6	6	6	6	8	6	6	6	6	6	0201/02/03/+	2402/03/04/+	4601/02	5201
047 Typing Lab	#04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2402/03/04/+	4601/02	5201
059 Hospital	#04A	6	8	8	6	6	6	6	8	6	6	6	6	6	0201/02/03/+	2402/03/04/+	4601/02	5201

Ave. 7.2 8.0 7.6 7.6 7.6 6.8 7.6 8.0 8.0 7.2 7.2 7.6 7.2

Kit: OneLambda MicroSSP 1L DNA Sample: H1503/R		1 E	1 A	2 G	4 F	4 D	4 C	4 G	6 D	8 G	9 D	10 F	10 D	10 C	10 B	11 A	11 C	11 B	Local Assignment					
Laboratory	Lot #	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
043 Hospital	#04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2402/03/04/+	4601/02	5201	0102/03	1202
045 Blood Center	#04A	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*02	*24	*52	*46	*1202	*01
050 Hospital	#004	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2402/03/04/+	4601/02	5201/012/013	nt	nt
058 Blood Center	#004	6	6	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	#	\$	B*4601-02	B*52011-013	Cw*0102-03	Cw*12021-022
076 Hospital	#04A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	2402/03/04/+	5201	4601/02	*01	*12
068 Blood Center	#04A	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	*02	*24	*46	*52	0102/03	1202

Ave. 7.0 7.3 7.3 7.3 7.3 7.7 7.3 7.0 6.8 7.7 5.8 6.8 6.8 7.2 7.2

A*02011-07 /09-18/21-38 /40-49/51
\$ A*2402101-07 /09N-13/15/17-18/ 20-23/25-30/32-33

Kit: Pel-Freez ABC SSP UniTray DNA Sample: H1503/R		1 B	1 G	4 A	4 B	4 G	7 F	8 E	8 F	10 B	10 E	11 D	11 F	12 G	Local Assignment					
Laboratory	Lot #	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
004 Blood Center	027.028	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/04/+	2402/03/04/+	4601/02	5201/02/03	0102/03/05	1202/08
006 Maker	028	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0201/02/+	2402/03/+	4601/02	5201/02/03	0102/03/05	1202/08
014 Hospital	027	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*0201/02/04/+	*2402	*4601/02	*5201/02/03	*0102	*1202
023 Hospital	028	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	*02	*24	*52	*46	*01	*12

Ave. 7.5 7.5 7.5 7.5 7.0 7.5 7.5 7.5 7.5 7.5 7.5 7.5 7.5

DRB1*04 や DRB1*13 などでは判定されるアリルが変わる可能性がある。現に、10C が陰性だった施設は、DRB1*0403/05/+ と報告しているのに対し、陽性であった施設は、DRB1*0401/02/+ と報告している。また、H1502/R の DRB1 は DRB1*0404 と

DRB1*1302 で、MicroSSP JPN では 10G, 10D, 10C, と 12H が反応する。このうち、10C のプライマーセットは基本的に DRB1*04 と DRB1*13 をそれぞれ 2 群に分けられるようになっている。しかし、このプライマーセットは、DRB1*04 と DRB1*13 の

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													

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	1	1	1	1	1501/02/+	0801/032/+	5*0101/02/+	-	0601/02/+	-						
015	Hospital	002	8	8	8	1	1	1	1	0801/03/05/+	1501/02/03/+	DRB5	-	0601/02/03/+	-						
018	Typing Lab	003	8	8	8	1	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	6				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	6				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

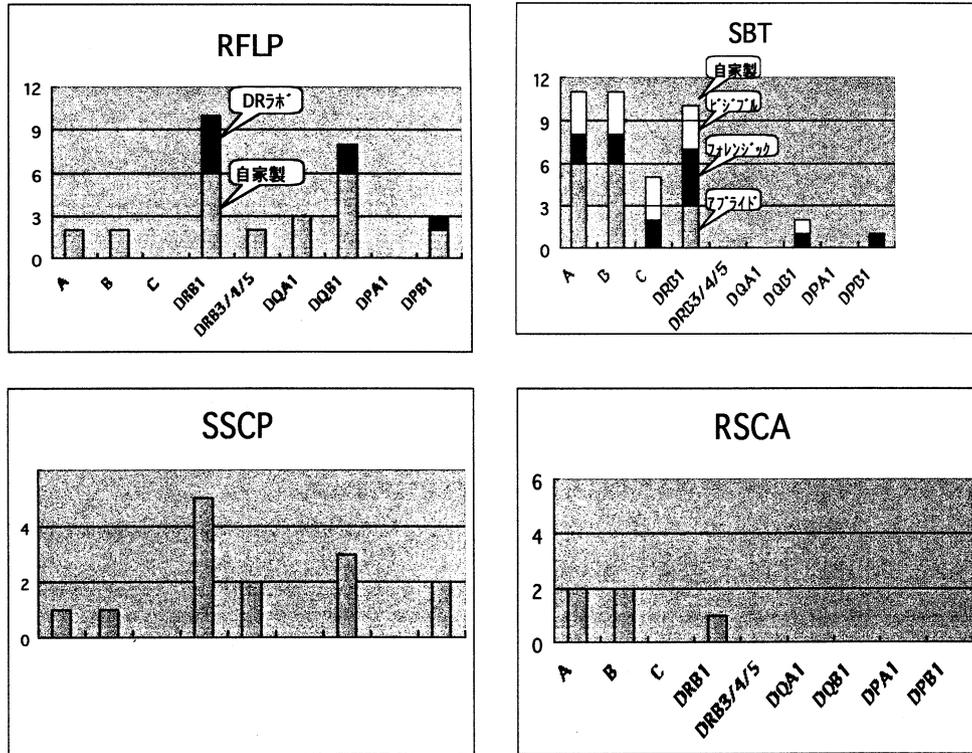


図1 方法別施設数

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。

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。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	
		n=30		
DRB3/4/5	SSO	23	Reli	23
	SSP	6	Micro-SSP	4
			Dynal-SSP Pel-SSP	1 1
SSCP	2	自家製	2	
		n=3		
DQA1	RFLP	3	自家製	3
	SSCP	1	自家製	1
		n=24		
DQB1	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
		n=5		
DPB1	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				
B	46	1種類	Reli+Luminex	1	Gene+Allele+ABI			
			RFLP+SSP	1	MPH+RFLP+SBT			
			SSP+SPP	1				
			Reli+RSCA	1				
			2種類	6	3種類	2		
C	19	1種類	MPH+SSP	1	3種のSBT+SSP			
			Reli+SSP	1				
			2種類	2	4種類	1		
遺伝子座		1種類	2種類	8	3種類	4	4種類	1
DRB1	49	1種類	Reli+SSP	2	MPH+SSP+SSCP	1	3種のSBT+RFLP	1
			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	
Reli+Luminex	1			
Reli+RSCA	1	3種類	2	
1種類	7			
B	47	Reli+SSP	2	Gene+Allele+ABI MPH+RFLP+SBT
		Reli+Luminex	1	
		RFLP+SSP	1	
		LABtype+SSP	1	
		SSP+SPP	1	
		Reli+RSCA	1	
1種類	2	1		
18	1			
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	1種類					
	30					
DQA1	1種類					
	3					
DQB1	20	2種類	4			
		Reli+SSP	1			
		MPH+SSCP	1			
		Reli+SSCP	1			
		RFLP+SSCP	1			
DPB1	1種類					
	4	2種類	1			
		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的方法による検査が大多数を占めていた。サンプル 1505R は 2 種類の的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 種類も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 300 ng 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 500 ng 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)

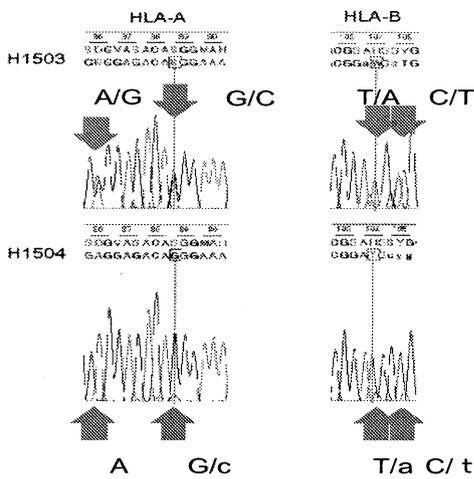


図1 SBT (ABI)

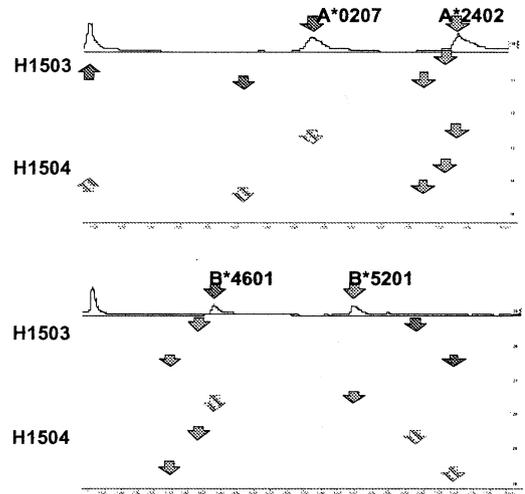
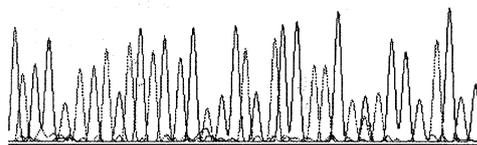


図2 -RSCA

forward
 980 1040 1120 1200 1280
 CAGGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTTGTGGCTGCCG
 70 80 90 100



A/G Tyr⁹⁹ (codon 123 TAT) : A*0201
 Cys⁹⁹ (codon 123 TGT) : A*0207

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

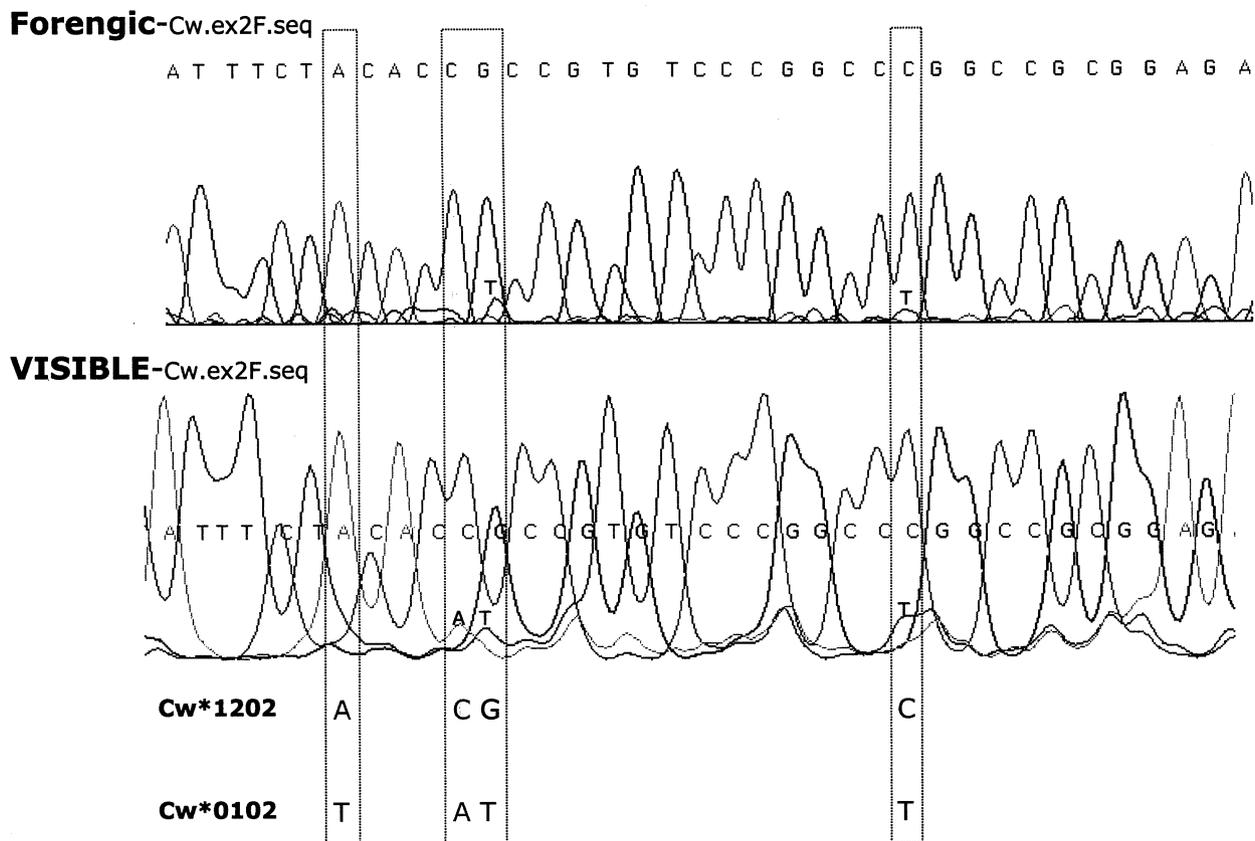


図1 Forengic 及び VISIBLE での H1504 の HLA-C タイピング結果

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

第2回日本組織適合性学会近畿地方会抄録

会 期： 2004年2月7日(土)
 会 場： 参天製薬株式会社本社
 世話人： 椿 和央
 近畿大学医学部奈良病院 血液内科
 共 催： 財団法人 大阪腎臓バンク

●教育プログラム●

臨床に貢献するための HLA 検査とは

丸屋 悦子

特定非営利活動法人 HLA 研究所

造血幹細胞移植 (SCT) 法の多様化が進んでいる。幹細胞ソースや前処置と GVHD 予防 Regimen の組み合わせは膨大な選択肢を可能にした。にもかかわらず、SCT の三大予後要因(年齢・病態・HLA 適合性)は不変のままである。年齢・病態は制限条件であり、これらに適應する Regimen の開発が求められる。組織適合性は工夫が可能と考える。臨床に貢献するための HLA 検査について考察し提案する。

1. HLA 基本編

HLA の命名法, 機能, マイナー組織適合性抗原や

NK とのかかわりなどについて概論を述べる。

2. 組織適合性検査材料について

DNA を用いた検査法により使用できる検査材料も多様化し, 患者やその家族に有利な検査材料の選択が可能になっている。この実情を紹介する。

3. SCT ドナー別, 組織適合性検査について

SCT 法の多様化に伴い, ドナー別に必須となる検査項目について提案する。

● 特別講演 ●

ゲノム多様性と疾患: HLA 領域内のどの遺伝子(群)がどのように疾患とかかわるのか?

木村 彰方

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子病態分野

HLA 領域は、移植や輸血の際などに認められる非自己抗原に対する免疫応答性の個体差を規定する遺伝子座として発見されたが、そこには HLA 分子をコードする HLA クラス I およびクラス II 遺伝子群以外にも、HLA クラス I 分子で提示されるペプチドの産生に関わるプロテアゾームやトランスポーターの遺伝子、TNF や LTA などのサイトカイン、C4 などの補体その他の免疫関連遺伝子や、機能未知の遺伝子を含めた極めて多数の遺伝子が存在する。それらの遺伝子群の多くは、HLA 遺伝子群ほどではないにしろ、それぞれが著明な遺伝的多型を示す。また、HLA 領域は遺伝子重複によって生じたと考えられる多重遺伝子族を形成するが、その重複数にも多型がある。さらに HLA 領域の多様性のあり方は、人種や民族によってアレルの頻度分布がかなり異なると共に、座位間の連鎖不平衡が存在し、人種や民族に特徴的なハプロタイプを形成する。

このように HLA 領域は著明な多型性を有する免疫関連遺伝子群が多数存在することから、これまでに自己免疫疾患、感染症、悪性腫瘍など種々の疾患との相関が検討され、特定のアレルと特定の疾患との相関が見い出されている。このことは、HLA 遺伝

子ないし HLA 分子そのものが疾患感受性を規定するものと推定されているが、疾患によっては相関を示すアレルが人種毎に異なることは良く知られた事実である。また HLA 領域の座位間の連鎖不平衡は極めて強く、疾患関連遺伝子のマッピングはそれほど容易ではない。また、我々は日本人の一般集団を対象として HLA 遺伝子自体の多型解析と合わせてマイクロサテライトの多様性を解析しているが、HLA 領域内の連鎖不平衡ブロックの長さは一様ではなく、ハプロタイプ毎にかなり異なっていることを見い出している。一般に、アレル間の連鎖不平衡の強さは、そのアレルの形成時期や頻度、さらには集団間の混血のあり様にも左右される。このため、HLA 領域内の連鎖不平衡の強さは必ずしも一様ではない。このことは、疾患との強い相関を示す領域であっても、必ずしもその連鎖不平衡ブロック内に疾患関連遺伝子があるとは限らないことを示唆する。

本講演では、HLA 領域におけるゲノム多様性のあり方と座位間の連鎖不平衡の特徴を疾患原因遺伝子マッピングとの関連で考察すると共に、我々の行っている最近の疾患研究と HLA との関連研究について紹介する。

● 特別企画 ●

『遺伝子解析をめぐる倫理問題』

1. 遺伝子解析をめぐる倫理的・歴史的・社会的課題

小原 克博

同志社大学神学部

1 はじめに——遺伝子解析の周辺

- 1) 一般社会における不安
- 2) 医学的見地からの欲求

事例「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」

(文部科学省, 厚生労働省, 経済産業省, 2001年)

1. 基本的考え方: 「人間の尊厳」「人権」の尊重
2. 研究者等の責務: 通常の職業倫理
3. 提供者に対する基本姿勢: インフォームド・コンセントの細則。「提供者が被る可能性のある不利益」の説明が必要であるとされているが, 具体的な言及は見あたらない。そもそも「説明文書」を理解できる人はどれほどいるのか。

4. 資料等の取り扱い: 技術的な問題。連結不可可能匿名化と連結可能匿名化。

- 3) 倫理およびアカウンタビリティ(説明責任)の必要性

異なる関心と欲求を, どのように橋渡ししていくのか。

科学的(医学的)探求心と, 市民レベルでの安心感情の折り合いの付け方。

- (a) こっそりと実施する。
- (b) アリバイ作りを精緻化する。
- (c) 内実を伴ったインフォームド・コンセント, 社会への情報開示。

2 倫理的課題

- 1) 価値多元社会における倫理とは何か

選択可能なものの中から(当事者にとって)最善のものを選択する方法を示すこと。可能な限りの選択可能性を示さなければ, 結果的に, 誘導・強制した

のと同じになる(パターンリズム [paternalism, 父親的温情主義]の危険性)。

遺伝カウンセリングにおいても誘導は可能。

- 2) (医療)技術と倫理

潜在的マイナス効果を悪用させないための倫理が必要。

潜在的プラス効果を妨害させないための倫理が必要。

- 3) 技術のジレンマ

病を治療し, 人々を健康にするはずの医療技術が, 同時に, 新たな問題を引き起こす原因にもなっている。

- 4) 健康への欲求

遺伝子解析は健康の追求の最先端に立つ技術の一つである。それは, 様々な欲望に取り囲まれており, 価値中立的な技術として規定することはできない。

3 歴史的課題

- 1) 人間の「本質」をめぐる問い

社会的・生物学的特質による区別(自由人と奴隷, 白人と黒人, 男性と女性, 健常者と障がい者, 優秀な人種と劣等な人種, 等)。

存在に値する生命(人間)と存在に値しない生命(人間)の区別。

遺伝子解析が高度化し, 一般化していくプロセスの中で, どのような新たな区別が生じるのか。

- 2) 遺伝学とナショナリズム

純化された健康志向は, 健康と見なされない者の排除と, しばしば表裏一体の関係にあった。

ナチス時代, 多くの研究者は善意に基づいて, 黙々と研究を進め, ナチスに協力した。小さな善意

の集積が、巨大な悪のメカニズムを支えるという歴史的事例は多数ある。

【参考文献】

R. N. プロクター『健康帝国ナチス』草思社、2003年。

藤野 豊『強制された健康——日本ファシズム下の生命と身体』吉川弘文館、2000年

4 社会的課題

遺伝子解析，遺伝子診断が高度化・一般化してい

く中で，次のような課題が生じてくる。

1) 人間は生まれたときから平等ではないことを明確に語られる。

2) 「内なる自然」としての人間の身体がバイオテクノロジーのフロンティアとされる。

3) DNA を操作することによって人間性そのものを操作することが可能となる。

4) 病気の概念が変容する。

小原克博 On-Line <http://www.kohara.ac/>

E-mail: katsuhiko@kohara.ac.jp

● 特別企画 ●

『遺伝子解析をめぐる倫理問題』

2. 近代医学と遺伝子医療の倫理

村岡 潔

佛教大学文学部

(1) 近代医学の思想的基盤

近代医学・現代医療の領域は、19世紀以降、自然科学(生物学、生理学、細菌学、統計学等)にその基本思想を依拠しつつ、20世紀には北米を中心に世界的に展開される「科学的医学」「生物医学」として発展してきた。これと並行して従来の全体論的生命観は、還元主義的な眼差しの下に変貌し、特に19世紀以降、臓器・組織から細胞レベルへ、さらに20世紀以降はDNAレベルへと還元可能な存在となっている。

近代医学の思想的基盤は、こうした人間機械論と特定病因論からなる。

「特定病因論」では、19世紀末の細菌学の確立以降、西洋近代医学が採用した疾病原因の説明体系で、人間を臓器別系統別に解釈し(人間機械論)、それぞれの「故障した」部分に病気の原因を定め、その部分を改善することで病気が治るとする。また、この理論では、感染症、例えば結核の根本原因は結核菌

という「病原体」の一点に集約され、病者から病原体を一掃することが正しい治療戦略とされる。

遺伝的疾患(ガンや高血圧症などの生活習慣病ないしは多因子遺伝病も含め)の根本原因は「擬似病原」として認知される遺伝子レベルの変異に求められる。その是正が根源的治療法(= 遺伝子治療)。医療者・研究者がもつ、こうした信念は特定病因論という生物医学モデルから必然的に形成されたものである。

(2) 生命倫理・医療倫理

20世紀後半以降、こうした生物医学の背景のもと北米を中心に出現した学際的領域であり、生命科学と現代医療において人間の行為を倫理原則から検討するために様々の人々が専門領域を超えて研究し合う学際的学問研究の領域である。周知のように、生命倫理は、体外受精や胎児診断、「脳死」と臓器移植といった、現代の死生観に関わる先端医療技術の検討から発展してきた。

生命倫理には①死の再定義(「脳死・植物」状態)、②終末期医療(安楽死・尊厳死、ホスピス)、③胎児診断と人工妊娠中絶、④生殖技術(体外受精、代理母)、⑤遺伝子医療(診断・治療)、⑥臓器移植と医療資源の配分など、幅広い課題が含まれる。

(3) 遺伝子医療の倫理的諸問題

後半では、以上の前提をふまえ、次の遺伝子医療に関わる生命倫理的諸問題について検討する。

① 遺伝子診断

遺伝子診断は、(1)被検者の血液をはじめ、あらゆる組織・細胞を検体(検査対象)にできる点;(2)ヒトの一生のどの時期でも診断可能で、発症前診断や胎児診断もできる点;(3)多くが、被検者本人だけでなく家族・親族の検体が必要になる点などの特徴があり、倫理的問題につながっている。それゆえに、被検者(や家族)が診断結果を利用する上で遺伝カウンセリングは重要な役割を担っている。

遺伝子診断は、多くの場合、従来の検査と違い、病気を患っている患者の現状を診断するのではなく、(A)検出された遺伝子変異から、今後、被検者に発現するであろう形態上の変化を予測する発症前診断であること。および、(B)得られる遺伝情報が、被検者本人だけでなく親・兄弟など親族の遺伝情報でもあること。こうした特性が、遺伝子診断がもたらす社会的・倫理的・経済的問題の根底にある(例:結果が生命保険や医療保険の契約時に利用される場合)。また、(C)予測の確度という点でも、高脂血症や高血圧症が示す漠然としたものではなく、ハンチントン病のように「遺伝子診断は未来を確実に決定付けているかのような印象」を与えるという特性もある。

このことは、多くの医療情報に対して「知る権利」が強調される今日でも、遺伝情報に関しては「知らないでいる権利」が主張される理由の一つだと言える。

② 遺伝子治療・遺伝子工学(生命操作)

ヒトゲノム解析によって、従来の遺伝病だけでなく、高脂血症などこれまで環境要因が強調されてきた生活習慣病さえも、その発現に関わる遺伝子「異常」が次々と識別されている。遺伝子治療とは、こ

うして解析され識別された遺伝子変異の知見に基づいて、標的とする「異常な遺伝情報のプログラム(擬似病原)」をDNAレベルで書き直そうとする治療戦略である。現時点では、ADA欠損症、家族性高コレステロール血症、従来の治療法でも難治の肺癌などの悪性腫瘍、エイズなどが対象である。また、広義には、動脈硬化、糖尿病の治療、あるいは心筋梗塞の治療の補強策、骨髄移植後の合併症対策なども含まれる。さらに、異種間の臓器移植(異種移植)をめざし拒絶反応のないブタとヒトのキメラ動物の研究なども行なわれている。

周知のように、遺伝子治療の研究は、次の条件下で慎重に推進されている。A)生命に危険が迫っている患者に限る(致死性の遺伝子疾患や従来の治療で無効ながん患者にも実験治療として試みられている)、B)患者本人の体細胞に限る(導入した遺伝子が将来の世代に受継がれる危険性がある精子、卵子、受精卵等は除く)、C)病気でない人の機能強化(例えば、身長を高くする目的で成長ホルモン遺伝子を入れる)や、知能・人格・器官形成などの人間特性の変更を意図する優生学的遺伝子操作は認めない、D)患者や被験者のインフォームド・コンセントを重視・確保し人権を保護する、などである。

③ 再生医療(細胞治療 Cell Therapy)

再生医療とは、自然には再生しない組織・臓器を再生させて、それによって、失われた機能を回復させようとする「人体改造」の試みである。近年、とくに注目されているのが成長して様々な組織・臓器を形成する能力を秘めた受精卵(胚)の研究から、その一部(胚性幹細胞;ES細胞;俗称「万能細胞」)を取り出し、希望どおり組織・臓器を培養育成し、それで患者本体の欠けた部分や機能を補おうとするアイデアである。この場合、幹細胞の遺伝子組成が患者と同じであれば、幹細胞からできた細胞・組織・臓器、および修復される患者本体は同一のクローンであり、本体への移植の際にも拒絶反応などの問題は極めて起こりにくいことが期待されている。

再生医療は、目下、3通りのやり方で研究が進められている。(1)生体外で組織を再生させる方法で、皮膚が試みられている。(2)生体内で、生体のもっている自己修復力(自然治癒力)を何らかの方法で引

き出して再生をはかる方法がある。再生の足場を築いたり，組織成長因子を使ったり，さらには，その組織成長因子をつくる遺伝子を導入する方法である。(3) 自分または他人の(分化能力のある)幹細胞を用いる方法である。この場合，すでに臨床応用されているのが，末梢の血液や臍帯血からの骨髄輸血(骨髄幹細胞の移植)である。

目下，幹細胞から組織再生までには多くの解決すべき問題がある。また，胚性幹細胞を培養して複雑な臓器をつくり，臓器移植にもちいることは現実からほど遠い。しかし，神経細胞などに分化させて細胞移植を行えば，パーキンソン病などの神経病の治療に応用できると考えられている。

(4) 倫理問題解決のためのアプローチ

大別すると，次の二つがある。

- ① 義務論的アプローチ: マクロ的・集団主義的
 - * 規範(ルール, ガイドライン)に照合させて，その行為が正しいかどうかを決める。
 - * 規範に合致している場合には，正しいこと(善)としてその行為を選択する。
 - * 評価の確定した「通常の」医療に適しているが，評価の未定な先端医療には適用しにくい。
- ② 目的論(帰結主義)的アプローチ: ミクロ的・個人主義的

* とり得る行為の選択肢をいくつか考慮し，それぞれの結果から生み出される価値(幸福)の度合いを予測・予想する。そのうちで，当事者にとって最も望ましい価値をもたらす選択肢(最も幸福をもたらすと予測されるもの;あるいは害が最少のもの)を善いこととして採択する。先端医療・実験的治療向き。

* 口演では，こうした観点をふまえ，次のような課題にも言及したい。

【主たる課題】

- ① 遺伝子診断・解析で得られた遺伝子情報は誰のものか?
- ② インフォームド・コンセント(情報開示)と「知らないでいる権利」は両立するか?
- ③ 遺伝子情報による差異化・差別化(新・優生学?)にはどう対処すべきか?
- ④ 再生医療(ES細胞)のために，受精卵は操作してよいか?
- ⑤ 遺伝子工学: キメラ動物(異種移植)やクローン人間を産み出すことはよいか?
- ⑥ 社会や医学界でコンセンサスが得られるのか?(あるいは，それは必要か?)
(佛教大学・文学部: 医学概論・医療思想史, E-mail: muraoka@bukkyo-u.ac.jp)

● シンポジウム『臓器移植に対して組織適合はどこまで必要か』●

臓器移植と HLA 検査

佐田 正晴

国立循環器病センター再生医療部

同種臓器移植は難治性の末期臓器不全に対する治療法として広く実施され，生命維持と QOL の改善を目的に定着してきた。現在，世界 50 ヶ国以上で腎臓，心臓，肝臓を中心に多種多様な臓器移植が年間 4 万例以上実施されている。

1970 年代に新しい特異的免疫抑制剤として開発されたシクロスポリンを皮切りに多くの免疫抑制剤が開発され移植医療に応用され，症例数も飛躍的に増加すると共に，移植成績も著しく向上してきた。移植成績の向上に伴い，それまで厳格に規定されてい

たレシピエントの年齢・原疾患などの移植条件が大幅に緩和されると同時に、HLA 完全不一致症例、ABO 型不適合症例や直接交差試験陽性例にまで移植適応が拡大された。

しかしこの適応拡大がその後の深刻な提供臓器不足を招いたことは歪めない事実でもある。

本シンポジウムのテーマ「臓器移植に対して組織適合はどこまで必要か」について、臓器移植前後に

施行されている、

1. HLA 適合度
2. 前感作抗体, 直接交差試験
3. 移植後の抗体スクリーニング

と移植成績について症例数が一番多く組織適合に関する解析が正確になされている腎移植を中心に検証していく。

臍帯血移植と HLA 適合性

甲斐 俊朗

兵庫医科大学輸血部

わが国の非血縁臍帯血移植は、HLA (A, B, DR) が血清学的に 4 抗原以上適合かつ 2×10^6 /kg 以上の細胞数を含むさい帯血を用いて行われている。このことは、さい帯血 T 細胞の特性、主にその未熟性故にさい帯血移植では重症移植片対宿主病の発症頻度が少ないとの欧米の報告に基づいて開始されたものであり、現在ではその殆どが HLA 不適合移植である。

本シンポジウムでは、兵庫さい帯血バンクから提供した造血器悪性疾患に対する初回移植としての骨髓破壊的さい帯血移植 91 例を対象とし、HLA 適合度と移植成績について解析したので報告する。

対象: 造血器悪性疾患 91 例 (AML 30, ALL 30, CML 17, 悪性リンパ腫 5, その他 9), 年齢中央値は 21 歳(範囲; 4 ヶ月-60 歳, 移植病期はスタンダードリスク 36, ハイリスク 55 例であった。HLA 適合度 (A, B; 血清学的, DRB1 high resolution DNA typing) は 3/6 適合 16 例, 4/6 適合 43 例, 5/6 適合 27 例, 6/6 適合 5 例である。

方法: 年齢, 性, 体重, ABO および HLA 適合度, 疾患, 移植病期, 移植細胞数(凍結保存時核細胞数, CD34+細胞数, CFU-GM 数), GVHD 予防法が移植成績(好中球および血小板生着, GVHD 発症

頻度, event free survival (EFS), 移植関連死 (TRM), 再発)に及ぼす影響を Kaplan-Meier 法によりまた log-rank test で $p < 0.10$ 以下の因子に関しては Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析により有意な因子を解析した。

成績: 単変量解析では、HLA 適合度が高いほど(5-6 適合 vs 3-4 適合)好中球生着率が高く(90.3% vs 74.4%, $p = 0.0040$), TRM が低く(9.6% vs 41.3%, $p = 0.0077$), EFS が良好(54.4% vs 22.6%, $p = 0.0146$)であった。重症 AGVHD の発症も有意に低かった(4% vs 24%, $p = 0.0150$)。5/6 適合移植(class I 不適合 vs class II 不適合)あるいは 4/6 適合移植(Class I vs class II vs class I+I 不適合)の中ではそれぞれ有意差は認めなかった。多変量解析では、好中球生着 (HR 1.746; 95%CI, 1.083-2.816, $p = 0.022$), 重症 AGVHD の発症 (HR 0.120; 95% CI; 0.015-0.936, $p = 0.0431$) に有意な影響を及ぼし、EFS には有意でないものの適合度が高いほど良好な成績が得られる傾向を認めた (HR 0.559; 95% CI 0.278-1.121, $p = 0.1013$)。

結論: 臍帯血移植においても HLA 適合性は重要である。今後症例数の蓄積が必要であるが、成人に対しては 3×10^6 /kg 未満の症例が多くこのような症例

に対しては HLA3-4 match より 5-6 match のさい帯 血を選ぶことにより成績の向上が期待される。

造血細胞移植と母子間免疫寛容

一戸 辰夫

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

20世紀初頭まで、「組織適合性」とは組織自体の類似性と理解され、異種動物も「適合した」ドナーとして皮膚や腎臓のみならず、睾丸の移植にまで用いられていた。この混沌の時代は、C. C. リトルの「移植の法則」の定式化、P. メダワーによる免疫学的現象としての拒絶の再発見を経て、はじめて終焉を迎える。その後「生物学革命」の揺籃期、ドウセによる白血球凝集素の発見を受けて、テラサキによって開発された“microdroplet assay”が、現代的な組織適合性の概念への扉をこじ開ける。そして、その確立に重要な役割を果たしたのが、経産婦の約30%に見られる配偶者由来 HLA 抗原 (inherited paternal HLA antigens, IPA) に対する同種抗体であった。一方、HLA の一致による自己と非自己の区別、という基準の出現は、同時に妊娠という現象を免疫学的なパラドクスとして再認識させることとなる。メダワーらによる「在胎期に暴露された同種抗原に対して、児は免疫寛容を獲得する」ことの発見は、クラスらによる「非遺伝母 HLA 抗原 (non-inherited maternal HLA antigens, NIMA) への抗体産生能の

低下」の発見へと受け継がれ、ここに「個体の免疫応答は、ゲノム上で規定されている HLA ばかりではなく、妊娠中に経験した NIMA によっても修飾されている」、という「もうひとつの」組織適合性基準が提唱されることとなる。これまで、同種移植における母子間免疫寛容効果を検討した研究は数多く実施されてきたが、その結果は玉石混交とでもいべきものであった。しかし、1990年代後半以降、再び NIMA 効果に対する見直しを開始され、腎移植や造血幹細胞移植の解析から NIMA への寛容効果を示唆する報告が相次いでなされている。この可能性をさらに押し進めるものとして、最近、本邦の臨床研究者たちは、母子間マイクロキメリズムを NIMA や IPA に対する免疫寛容の指標と見なす新しいドナー選択方法によって、HLA の一致していない血縁者間においても造血幹細胞移植が実施可能であることを報告している。本講演では、このような母子間免疫寛容仮説に基づいた造血幹細胞移植の現状を報告し、今後その確立へ向けて解決すべき課題のいくつかを提示したい。

造血幹細胞移植における組織適合性戦略を展望する

佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

臓器移植と造血幹細胞移植 (SCT) では次の点で異なる戦略が必要になる。

1. SCT では Donor 免疫担当細胞によって Recipient の免疫が再構築される
2. 腫瘍症例の SCT では Graft versus Tumor (GVT) 効果を期待する
3. SCT では拒絶より GVHD 制御に重点が置かれる

以上の観点から, GVHD 方向の HLA-A, B, DR 適合性が重視され, HVG 方向の不適合性は, 骨髄廃絶を含む, 強い免疫抑制によって制御可能である。Non-myeloablative transplantation (ミニ移植)や, 弱前処置による SCT (RIST) という選択肢も採られるようになり, 免疫抑制剤の進歩は HLA ミスマッチ donor からの移植を可能にしつつある。加えて Donor ソースも多様化した。とくに非血縁間移植は臓器移植よりハードルが低い。

マイナー組織適合性抗原 (mHA) は HLA 適合 SCT における GVHD や GVT の主要な標的分子である。GVHD 発症へのマグニチュードは HLA と同等またはそれ以上と評価される。遺伝学的観点から, 非血縁間の mHA 不適合確率は, 近縁係数の高い同胞や親子間の約 2 倍と計算される。血縁 haploidentical で HLA-A, B, DR の 1 抗原ミスマッチは, 非血縁間フルマッチと同等またはそれ以上の総合的適合性と評価される。後方視的臨床解析もそれを肯定する。

スタンダード・リスク症例への SCT はほぼ標準

化され改善の途上にある。予後不良ハイリスク症例の救済に照準が当てられつつある。ハイリスク症例の腫瘍細胞は高い変異能を獲得した「進化した腫瘍」であり, 治療により進化的に選択された「治療抵抗性の腫瘍」である。強くて広範囲特異的な GVT 効果(が得られる戦略)を必要とする。単一分子標的治療はライフルのように強烈な一撃を加えることができるが, 「進化した腫瘍」は変異を得意とするゆえにこれだけでは制御できない。SCT はミスマッチ mHA という多数の標的をもつアロ免疫療法であり, いわばショットガンのようなものである。変異能の高い腫瘍の制御に適していると思われる。

以上の視点は「血縁 haploidentical ミスマッチ移植」の適用を促進することになる。

1. IPA/ NIMA コンセプト(母児免疫寛容)による GVHD の軽減と GVT 効果の増強
2. Haploidentical による免疫再構築の保証
3. HLA ミスマッチによる, GVT 効果への HLA の関与
4. HLA ミスマッチによる, NK や NKT 細胞の GVT への関与, Cw 座の重要性などについて述べる。

SCT の最大の問題点は治療関連死亡 (TRM) 率が高いことであり, 慢性 GVHD を含む長期予後の改善が必要なことである。それが制御可能になれば難治性 / 進行期の固形腫瘍へ SCT が適用される時代が来る。

● 一般演題 ●

自動 DNA 分離装置 (BioRobot EZ1) を用いた 濾紙血痕・スワブ・組織・血液からの DNA 分離

二神 貴臣, 二家本 哲生, 大沼 豪, 辻野 貴史, 丸屋 かおり,
宮崎 豊人, 丸屋 悦子, 佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

【はじめに】

近年 PCR 法を用いた種々の臨床検査法の確立により, 高感度で精度の良い臨床検査が可能となり, 医療への貢献度を増している。種々の材料より純度の高い DNA を迅速かつ簡単に自動分離できることは PCR を用いた医療検査全体にとって有用なことである。我々は自動 DNA 分離装置, BioRobot EZ1 (キアゲン社) を用い, 濾紙血痕・口腔内粘膜細胞・爪・血液などからの DNA を分離し, 組織適合性検査に使用可能な DNA が得られるか検証した。

【材料・方法】

血液腫瘍患者およびその家族の血液・濾紙血痕・口腔内粘膜・爪, total 100 サンプルを用い, Bio-Robot 法と用手法 (Jet Quick 法・GENOMED 社) で分離した DNA の収量を比較した。さらに HLA-class I and II typing に使用可能か否かを検討した。

【結果・考察】

• 各種材料より抽出された DNA 量(平均)を以下の表に示す。

材料	数	BioRobot	Jet Quick
血液 200 μ l	43	3.5 μ g	3.8 μ g
血液 2 ml	24	17.8 μ g	17.7 μ g
口腔内粘膜	19	5.2 μ g	2.9 μ g

濾紙血痕からの DNA 抽出量は微量であるため, 濃度測定は行なわず, 精製 DNA 泳動像および HLA-class I/II typing test 用増幅実験と検査のみ行なった。

• 工程は血液: 15 分, 濾紙血痕・スワブ: 30 分であった。

• HLA-Class I and II typing kit (Wakunaga MPH-2) による増幅像

精製口紙 DNA; 径 2 mm 濾紙血痕 (HLA LabCard) をパンチ・洗浄・乾燥し, パンチ濾紙片 1 個を PCR に直接アプライして増幅させる。

• HLA-A, B, C, DR and DQ とともに従来法での精製 DNA と変わらず増幅できた。

• HLA-class I and II typing 結果は従来法と変わりがなく, すべてタイプ可能であった。

Luminex による HLA-A, B, C, DR, DQ typing の試み

丸屋 悦子, 二神 貴臣, 二家本 哲生, 大沼 豪, 辻野 貴史,
丸屋 かおり, 宮崎 豊人, 佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

【はじめに】

造血幹細胞移植の多様化が進んでいる。治療の導入部ともいえる組織適合性検査についてより患者サイドに立った検査方法の開発が必要である。組織適合性検査のコスト削減と検査に使用可能な DNA 材料の多様化による患者家族の負担軽減をめざし、Luminex を用いた HLA-A, B, C, DR, DQ typing の検討をおこなった。

【材料・方法】

材料の多様化をめざして: ろ紙血痕・口腔内粘膜細胞・末梢血を検査検体として使用した。

- ろ紙血痕の有利性: DNA を用いた検査法はごく微量の DNA 材料で検査を可能にする。血痕(100 μ l)をつけたろ紙検体はドナー候補者への採血量に対する圧迫感を軽減し・採血時期を問わず、検体輸送とその保存が簡単で安価(室温保存)である。
- 口腔内粘膜細胞の有利性: 患者家族が国内・海外と散在する場合、口腔内粘膜細胞はドナー自身で採取可能であり、採血に対する恐怖感・痛感もなく特に小児ドナーに有利、輸送も常温・封書で送ることができ、患者とその家族に経済的な負担を軽減できる。

Luminex による HLA-typing: LAB Type (One

Lambda 社)を用い、使用ビーズを通常法の半量にし、ハイブリダイゼーションに用いる増幅産物の増幅効率や使用量を検討することにより、コストダウンを試みた。HLA-class I, II の結果を従来法 (MPH-2) と比較した。

【結果・考察】

HLA-class I typing:

DNA 材料に適した増幅条件の設定により十分な増幅産物が得られた。半量のビーズでも従来法で得られる結果と同等またはより resolution の高い結果が得られた。

HLA-class II typing:

HLA-DQ typing については class I と同様な結果が得られた。HLA-DR typing については現在検討中である。

解析ソフトについて

結果を解析するソフトは NMDP 用に構築されたもので、改良・改変が望まれる。今後、その問題点を整理し、メーカー側へ伝え理解を求め、改良を検討していく。組織適合性検査は益々需要が見込まれる。十分な社会貢献を果たすためにはより安価で正確・迅速な検査法の樹立が責務である。

セルラインを用いた HLA 領域内マイクロサテライト解析

太田 正穂¹⁾, 齊藤 敏¹⁾, 福島 弘文¹⁾, 勝山 善彦²⁾,
成瀬 妙子³⁾, 猪子 英俊³⁾, 佐田 正晴⁴⁾

1) 信州大学医学部法医学教室, 2) 信州大学医学部付属病院薬剤部,
3) 東海大学医学部分子生命科学, 4) 国立循環器病センター再生医療部

【目的】

染色体上に比較的均一に分布し、高度な多型性を示すマイクロサテライト多型形質は、疾患感受性遺伝子や原因遺伝子の検索、親子鑑定や個人識別をはじめ多くの分野で活用されている。しかし、精度の高い解析結果を得るためには、構造が解明されているマイクロサテライトや単純繰り返し構造で多型性に富むマイクロサテライトを用いることが望ましい。このような事情を踏まえて、我々は HLA 領域内に見つけたマイクロサテライトの中で有効なものを検索し、第 10 回国際組織適合ワークショップで配布された B セルラインについて解析し、HLA 遺伝子との連鎖を調べた。

【材料と方法】

検査に用いたサンプルは、第 10 回国際組織適合ワークショップで配布された 74 種類の B セルラインから抽出した DNA を用いた。マイクロサテライトは HLA 遺伝子領域内にある 38 種類を選んだ。マイクロサテライト多型は、プライマーの一方に蛍光

色素 FAM, TET, HEX を標識し、PCR を行った後、ABI377 自動シーケンサーを用いたフラグメント解析で決定した。また、アレル決定のためのコントロールには、遺伝子配列が既知の B セルライン PGF と COX の DNA を用いた。

【結果と考察】

HLA-A の 265 Kb テロメア側にある D6S2972 から HLA-DQB1 の 329 Kb セントロメア側にある M2-2-22 まで、ほぼ 3.3 Mb の間に設定したマイクロサテライト解析では、HLA 型が全く同じセルライン (MOU と PIPOUT や SCHU と HO104) のアレルは総て同型であった。各 HLA ローカスを基にその周辺のマイクロサテライトのアレルを解析すると、200 Kb から 600 Kb に渡る様々な長さをもった特徴的なハプロタイプが見られた。特に HTC を用いたセルラインのマイクロサテライト多型解析結果は、HLA と連鎖するハプロタイプの判定や、移植医療での検査に有効な情報をもたらすと考えられる。

非血縁者間骨髄移植におけるゲノムワイドな マイナー組織適合抗原遺伝子の検索

成瀬 妙子¹⁾, 李 素雲¹⁾, 佐々木 佳奈¹⁾, 志知 大輔¹⁾, 河田 寿子¹⁾,
猪子 英俊¹⁾, 勝山 善彦²⁾, 太田 正穂²⁾, 森島 泰雄³⁾

1) 東海大学医学部基礎医学系, 2) 信州大学医学部法医学教室, 3) 愛知県がんセンター

【目的】

造血幹細胞移植は、移植後の拒絶や重篤な GVHD の発症を防ぐため、ドナーと患者の HLA を適合させて行われる。しかし、HLA が適合した組み合わせであっても、GVHD を発症する場合があります、重症度に差が見られることが報告されている。この原因として HLA 以外のマイナー組織適合性抗原 (mHA) の存在が考えられるが、これまで mHA に関する研究は散発的に行われているのみで、遺伝子座の同定や詳細な存在箇所は不明なものが多いのが現状である。

我々は、ヒト染色体上に我々が設定した 30,000 個の多型マイクロサテライトマーカーを用いて、骨髄移植におけるドナーと移植患者の DNA 多型を検索し、両者で不適合が見られる遺伝子領域を特定することにより、mHA 遺伝子を同定することを試みている。今回は第 6 番および 22 番染色体について報告する。

【材料と方法】

日本骨髄バンクを介して非血縁者間骨髄移植が施行された、HLA-A-B, -C, -DRB, -DQB 遺伝子完全一致の白血病患者と骨髄提供者 100 組を対象とし、

急性 GVHD 発症度 0 から IV 度に分類した。方法は、第 6 番染色体 HLA 領域に存在する 13 種、および第 22 番染色体長腕 13.0 Mb から 23.0 Mb に存在する 37 種のマイクロサテライトマーカーを用いて、個々のマーカーにおける患者とドナーの繰り返し数を検出後、患者、ドナー間での繰り返し数の差異を検討した。

【結果および考察】

第 6 番染色体においては、それぞれのマーカーにおいて 46%–97% の一致率を示したが、HLA 遺伝子との距離が短いマーカーほど一致率が高値を示し、マイクロサテライトマーカーが遺伝子多型の一致、不一致を検索する上で有用な指標となりうることを示した。第 22 番染色体における不一致では、37 種のうち 3 種に正の相関が認められたが、この中で 17.89 Mb, 21.54 Mb に存在する 2 種については、既知、新規遺伝子が密に存在している領域であることから、この付近に急性 GVHD の発症に関与するなんらかの遺伝子が存在する可能性が示された。今後、移植後 GVHD とこれら遺伝子の関係が明らかになれば、重篤な GVHD の予防や治療法の確立につながると期待される。

HLA 遺伝子欠損; ハプロおよび座位特異的 LOH と DRB 欠損遺伝子を疑う症例(予報)

二家本 哲生, 二神 貴臣, 大沼 豪, 辻野 貴史, 丸屋 かおり, 丸屋 悦子, 佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

【はじめに】

造血幹細胞移植を目的とした家族の組織適合性検査の結果, HLA-DRB 欠損遺伝子の存在が示唆された1家系と, 造血器腫瘍の急性期に HLA の LOH (loss of heterozygosity) がみられた3症例について予報する。

【材料・方法】

- Case 1: 悪性リンパ腫の患者(16♀)とその両親の血液・爪を用い HLA-A, B, DR and DQ typing を行なった。さらに9種のマイクロサテライトを用い親子の遺伝関係を確認した。
- Case 2: 急性期 ATLL (blast 70%) の患者およびその兄弟の血液および患者の口腔内粘膜細胞を用い HLA-A, B, C, DR typing を行なった。
- Case 3: 再生不良性貧血 (MDS の疑い) の患者の血液と口腔内粘膜およびその家族の血液を用い HLA-A, B, DR typing をおこなった。
- Case 4: AML 患者とその同胞7名の HLA-A, B, DR typing を行なった。

【結果・考察】

Case 1: 患者および両親の HLA typing の結果, HLA-DR 座において父子間にその遺伝関係が否定される結果が得られた。患者の体細胞由来 DNA を用い検査した結果, LOH 現象はみられなかった。9種のマイクロサテライトを用い患者と父の多型性を検査した結果, 父子関係は否定されなかった。HLA-

DRB 座に欠損遺伝子の存在が示唆された。

Case 2: ATL 細胞が末梢血液に70%存在時の血液由来 DNA と口腔内粘膜(体細胞)由来 DNA を用い HLA-typing をおこなった。体細胞 DNA では B*5901-C*0102 が検出され, 血液由来 DNA では検出されなかった。HLA-B, C 座で LOH 現象が見られた。

Case 3: case 2 と同様に, 血液由来 DNA と体細胞由来 DNA で HLA-typing をおこなった。血液由来 DNA ではハプロタイプ HLA-A*2601-B*4002/3-DRB1*1405 が体細胞由来 DNA で検出できるおよそ 1/3 から 1/4 の強度で検出可能であった。

Case 4: 患者とその同胞7名の HLA-A, B, DR typing 結果より4種のハプロタイプが検出され, 患者の HLA-B 座に B35 が loss していると考えられる結果が得られた。体細胞 DNA による確認はできなかった。

造血幹細胞移植目的の家族検査およそ400件中に検出された症例である。わが国では HLA-B61 の LOH が多数報告されているが, 本報告では3例中1例が B61 ハプロタイプ LOH であった。癌細胞の免疫監視機構からのエスケープ戦略とされる LOH 現象はそれほどまれな現象ではない。造血幹細胞移植目的のタイピングでは LOH 検出が, ドナー選択と GVL 効果の評価に重要と考える。

HLA 全領域における SNPs による口唇口蓋裂症 感受性遺伝子の検索

中西 真理¹⁾, 実藤 信之¹⁾, 下嶋 典子¹⁾, 羽竹 勝彦¹⁾, 石谷 昭子¹⁾, 志田 裕子²⁾,
高戸 毅²⁾, 玉置 盛浩³⁾, 徳永 勝士⁴⁾, Daniel E. Geraghty⁵⁾

1) 奈良県立医科大学法医学, 2) 東京大学医学部顎口腔外科, 3) 奈良県立医科大学口腔外科,
4) 東京大学人類遺伝学, 5) Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目的】

口唇裂 (CL) あるいは口蓋裂症 (CP) の発生は一卵性双生児においても 100% 一致せず, また単純にメンデル遺伝に従ってはいない。このことから, この疾患は環境要因と遺伝的要因の相互作用による多因子疾患であると考えられている。病因に関してはこれまでの研究において, HLA 遺伝子の関与が報告されている。Sakata らによると, CL/P と HLA-B*1501 (女性), B*5101 (男性) が相関を示すと報告された。我々は, これまで全 HLA 領域にわたる single nucleotide polymorphisms (SNPs) を検索し, これら SNPs のタイピングを SSP 法により行うための primer をデザインしてきた。今回, 口唇口蓋裂と強い相関があると言われている, HLA-B1501 や B5101 が真の責任遺伝子か, あるいは近辺の他の遺伝子かを調べる目的で, これら SNPs primer set のうち 100 SNPs の primer set を用いて SNPs タイピ

ングを行い, 疾患との相関解析を行った。

【材料・方法】

患者群としては, 東京大学顎口腔外科における手術例より 70 名, 健常対照群として, 東京都近辺在住者 70 名より, インフォームドコンセントを得て末梢血を採取し, それより DNA を抽出した。

SNPs タイピングは SSP 法により 100 SNPs をタイピングした。HLA タイピングは HLA-B ローカスについては, PCR-SSO 法で行った。

【結果および考察】

健常群を対照として相関解析を行ったところ, HLA-B51 ($\chi^2 = 6.8$), HLA-B 遺伝子に近い SNP JD40 ($\chi^2 = 3$), MICA に近い SNP JD44 ($\chi^2 = 12$), MICA 遺伝子内 SNP ($\chi^2 = 6.6$) で相関が認められた。現在, この結果が HLA-B が原因であるか MICA が原因であるかの検討中である。

非寛解期造血器腫瘍に対する母児間免疫寛容による 血縁者間 HLA 不適合移植

芦田 隆司, 川西 一信, 杉山 昌史, 玉置 千勢,
宮武 淳一, 内木 義人, 松田 光弘, 金丸 昭久

近畿大学 血液・腎臓・膠原病内科

【はじめに】

近年, 母児間免疫寛容の観点から, HLA が不適合であっても血縁者間移植が施行できる可能性が拡大してきた。今回われわれは適切なドナーがなく, 早急に造血幹細胞移植が必要と考えられた4例の非寛解期造血器腫瘍に対して母あるいは児をドナーとして移植を行ったので報告する。

【対象症例】

症例 1) 23 歳, 男性。AML, 第 1 再発期。ドナー: 母。症例 2) 19 歳, 男性。ALL, 骨髄移植後再発。ドナー: 母。症例 3) 39 歳, 女性。MDS overt。ドナー: 児。症例 4) 25 歳, 女性。非ホジキンリンパ

腫, 非寛解期。ドナー: 母。

【結果】

症例 1 は速やかに生着するとともに完全寛解となり, 生存中である。急性 GVHD (grade I) を認めた。症例 2 は一時寛解となったが, その後再発し死亡した。症例 3 および 4 は病勢の進行が顕著で評価不能であった。

【考察】

HLA 不適合母児間移植は非寛解期造血器腫瘍に対して完全寛解を達成し, 長期生存可能な症例が得られた。今後適応条件を明確にする必要があると思われる。

進行期造血器悪性腫瘍に対する母児免疫寛容に基づく T 細胞非除去 HLA 不一致造血幹細胞移植

淵田 真一¹⁾, 山田 紀子¹⁾, 内田 亮¹⁾, 岡野 晃¹⁾, 岡本 雅司¹⁾,
落合 直也¹⁾, 島崎 千尋¹⁾, 丸屋 悦子²⁾, 佐治 博夫²⁾

1) 京都府立医科大学大学院医学研究科血液病態制御学, 2) HLA 研究所

【目的】

母児間マイクロキメリズムは母児間の免疫寛容の存在を示唆する。この仮説に基づき進行期造血器悪性腫瘍に対して母児間, 児母間, NIMA 不一致同胞間における T 細胞非除去 HLA 不一致造血幹細胞移植を行ったので報告する。

【対象・方法】

適切なドナーの得られない進行期造血器悪性腫瘍(非寛解期) 12 例。男性 6 例, 女性 6 例。年齢 17-64 歳。慢性骨髄性白血病(急性転化) 2 例, リンパ芽球性リンパ腫 3 例, 非ホジキンリンパ腫 2 例, 多発性骨髄腫(形質細胞性白血病を含む) 3 例, 急性骨髄性

白血病2例。HLAはGVHD方向に3座不一致9例、2座不一致3例。母児間4例、児母間3例、NIMA不一致同胞間5例。移植前処置はCA+CY+TBI6例、Ful+MeI5例、BU+CY1例。GVHD予防は全例FK 506+mini dose MTX。幹細胞は11例がPBSC、1例がPBSC+BM。輸注CD34陽性細胞数は $1.26\text{--}3.57 \times 10^6/\text{kg}$ 。

【結果】

全例速やかに生着し急性GVHDは評価可能11例中0度1例、I度5例、II度4例、III度1例に認め、特に児母間、NIMA不一致同胞間では7例中5例がI度以下であった。慢性GVHDは評価可能10例中

6例に認めた。100日以内の死亡は評価可能11例中1例のみであり、2年生存率60.6%であった。合併症としては1例にFK脳症、10例にTMA、8例にサイトメガロウイルス抗原血症を認めた。

【考察】

本移植法はHLAが2-3座不一致であるにもかかわらず生着は速やかで急性GVHDのコントロールも比較的容易であった。また4例で免疫抑制剤の投与中止が可能であった。T細胞除去やCD34陽性細胞移植と比較し再発や感染症のリスクも少ないと考えられHLA一致ドナーが得られない症例においても移植を可能とする有用な方法と考えられた。

日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定

1. 投稿規定

1.1. 原稿様式

提出原稿がそのまま電算写植で印刷できるように、原稿は全て、コンピューターのフロッピーディスクとA4サイズでプリントアウトしたものの両者を提出する。ソフトはMSWordとする。字体、サイズ、行の字数、行間、などの体裁は自由とする。また、図表については、写植でそのまま掲載できるものを提出するが、挿入箇所を本文に指定する。図については天地を明示する。印刷の際に、縮小または拡大する場合があるので、考慮すること。また、図表の題や説明はワードで、本文とは別頁に添付する。なお、掲載された論文等の著作権は、日本組織適合性学会に属し、インターネットを通じて電子配信されることがあります。

1.2. 原著論文

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

Nucleotide sequence for a Cw8 subtype, Cw8N, and its association with HLA-B alleles. Fumiaki Nakajima¹⁾, Yoshihide Ishikawa²⁾, Junko Nakamura¹⁾, Toshio Okano¹⁾, Chieko Mori¹⁾, Toshikazu Yokota¹⁾, Ling Lin^{2) 3)}, Katsushi Tokunaga¹⁾ and Takeo Juji¹⁾

- 1) Kanagawa Red Cross Blood Center, Kanagawa, Japan
- 2) Department of Research, Japan Red Cross Central Blood Center, Tokyo, Japan
- 3) Department of Transfusion and Immunohematology, University of Tokyo, Tokyo, Japan

HLA-Cw8 のサブタイプ “Cw8N” の塩基配列および

HLA-B 座との関連分析

中島 文明¹⁾, 石川 善英²⁾, 中村 淳子¹⁾, 岡野 俊生¹⁾, 森 知恵子¹⁾, 横田 敏和¹⁾, 林 玲^{2) 3)}, 徳永勝士²⁾, 十字 猛夫²⁾

- 1) 神奈川県赤十字センター, 検査課,
- 2) 日本赤十字中央血液センター, 研究一課,
- 3) 東京大学医学部附属病院, 輸血部,

内容は二頁目よりはじめ、要約 (Summary), はじめに (Introduction), 材料と方法 (Materials and Methods), 結果 (Results), 考察 (Discussion), 参考文献 (References) の順に記載する。また、要約の末尾に日本語で5語以内のキーワードを加える(英文の場合には英語の Key words を加える)。脚注は適宜、設けてもよい。日本語で投稿の場合には、末尾に英語のタイトル、著者名、所属(様式は上述に従う)、英語の要約と英語で5語以内の Key words をつける。枚数に特に指定はないが、速報的な短報(全体で、2,000~3,000字、出来上りA4版で2~4枚程度)を中心とする。もちろん、full article も歓迎する。また、新対立遺伝子、日本人に認められた希な対立遺伝子に関する報告も受け付ける。なお、参考文献 (References) の記載については、下記 1.5 を参照すること、オリジナル1部にコピー3部を添えて、編集長宛(下記3参照)に送付する。

1.3. 総説、シリーズその他

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

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

脚注は適宜，設けてもよい。なお，参考文献 (References) の記載については，下記 1.2. を参照すること。

1.4. 校正

校正は編集委員が行い，特別な場合を除き，執筆者は校正を行わない。

1.5. 参考文献

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

1. Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, *et al.*: Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asian. *Tissue Antigens* **57** (1): 1–8, 2001.
2. Tokunaga K, Imanishi T, Takahashi K, *et al.*: On the origin and dispersal of East Asian populations as viewed from HLA haplotypes. *Prehistoric Mongoloid Dispersals* (eds. Akazawa T, Szathmary

EJ), Oxford University Press, p. 187–197, 1996.

3. 徳永勝士，尾本恵市，藤井康彦ら：HLA に連鎖した遺伝標識に関するハプロタイプ調査，移植，**18**: 179–189, 1983.
4. 徳永勝士，大橋 順：疾患遺伝子の探索．わかる実験医学シリーズ「ゲノム医学がわかる」（菅野純夫編），羊土社，p. 48–55, 2001.

2. 別刷

原著論文については，別刷は有料とする。その費用は部数，頁数による。

3. 原稿送付先

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
東京大学大学院医学系研究科
人類遺伝学分野
日本組織適合性学会誌 MHC
編集長 徳永 勝士

TEL: 03-5841-3692

FAX: 03-5802-2907

E-mail: tokunaga@m.u-tokyo.ac.jp

編集後記

MHC 誌も 10 巻を数え、編集委員長も初代の猪子先生から徳永先生へと引き継がれ、表紙の体裁も新しくなりました。学会大会も次回の大会が第 13 回となります。13 年前にそれまでの組織適合性研究会を学会に改組した当時、この学会が安定して発展してゆけるのかと心配する向きが多々ありました。しかし、毎年大会の開催から始まって、学会誌の発行、認定制度の確立と、学会発足当時に目標とされていた事業も次々に実現し、着実な発展をとげることができました。

学会発足時に想定された事業が一応達成された今、ではこの学会の次の目標はどうあるべきかと考えます。HLA の研究は、当初のいかに正確に検査するかという時代から、検査結果をどのように利用するかという時代になりました。利用の方面も移植や疾患感受性にとどまらず、免疫機構の研究、ゲノム医学への応用、人類遺伝学への応用など多岐にわたってきています。この MHC 誌への投稿原著論文も多方面の分野にわたっています。そのような中で、会員がどのような総説を望んでいるのかが気になっております。総説としてまとめたものを読んで見たい分野がありましたら編集委員にご連絡ください。ご自分で執筆して投稿されてもかまいませんし、執筆者を推薦いただいてもかまいませんが、分野だけで執筆者の心当たりが無い場合でも、編集委員が適当な執筆者を捜し出して依頼したいと思います。

大谷 文雄

MHC バックナンバー

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

入会・変更

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

(社)学会事務センター

〒113-8622

東京都文京区本駒込 5-16-9 学会センター C21

TEL: 03-5814-5810

FAX: 03-5814-5825

日本組織適合性学会ホームページ

学会活動に関する情報や HLA 遺伝子の塩基配列情報が利用できます。

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

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

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

2004 年 5 月 31 日発行 11 巻 1 号, 2004

定価 2,000 円

発行 日本組織適合性学会(会長 猪子 英俊)

編集 日本組織適合性学会編集委員会(編集担当理事 徳永 勝士)

平成 8 年 7 月 24 日 学術刊行物認可

日本組織適合性学会事務局(事務担当理事 十字 猛夫)

〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門内

印刷・研究社印刷株式会社

〒352-0011 埼玉県新座市野火止 7-14-8