

第8回 HLA-QC ワークショップレポート

第8回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過—

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研究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) 日本薬科大学生物学, 6) 国立病院機構千葉東病院 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8回目を迎えたHLA-QCワークショップ(QCWS)は、昨年度に引き続き認定制度委員会の主催で実施された。平成15年9月にQCWS部会において今年度のQCWSの大まかな方針が討議された。平成15年11月にMHC誌上と学会ホームページ上にQCWS案内が出され、平成16年3月の締め切りまでに175名(74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、4月に施設単位としてサンプルを発送した。平成16年6月のデータ送付締め切りまでに、72施設から解析データが収集された。それらのデータを一括してMOに記録し、7月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)

表1 第8回QCWSの実施経過

時期	実行内容
平成15年9月	第8回QCWSの方針決定
平成15年11月	第8回QCWS案内の作成、MHCおよびHPへの掲載
平成16年3月	参加申し込み受け付け(74施設、175名)
平成16年4月	QCWS部会(H16.4.2)において具体的なサンプルの決定、解析担当者の決定、QCWS集会の方針決定
平成16年4月	QCWSサンプルの配布
平成16年6月	データ締め切り(72施設より回答)
平成16年6月	QCWS集会のみの参加者募集追加(3施設、3名)
平成16年7-8月	サンプル構成の公表、データ解析
平成16年9月	QCWS集会用資料配布(77施設)

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)少量試料からのタイピングの3テーマとした。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。そのため今回の 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やがん研究に用いられているがん細胞株を用いた。(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 H1601, H1602 は、日本人由来ではないがん細胞株の DNA である。また、(2) の目的では、HLA クラス I 領域欠損細胞株に HLA 遺伝子の PCR 産物(表 3)を混入した H1603, および 2 種類の細胞株 DNA を 9:1 で混合した H1604 を作製した。一方、(3) の目的では、ろ紙にスポットした細胞から、い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。なお、H1605 は H1604 で用いた DNA のもとである細胞株を 1:9 の比で混合した。(表 4)

3. ろ紙に付着した細胞からの DNA 抽出

ろ紙付着細胞からの 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 100,000 個の細胞を

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プ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変わらない。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

表 2 DNA ソースとなった細胞株とその HLA 型

Cell ID	A	B	C	DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
A549	2501, 3001	1801/17N, 4403	nd	0701, 1104	0202/12	0101/03/0 6		0201,0501/03/05	0201/02. 0301/+	0103	0301, 0601
THP-1	0201, 2402	1511, 3501	nd	0101, 1501			0101	0101/04/05, 01012/03	0501, 0602/11/20	0103, 0202	0201, 0402
LCL72 1.221	del	del	del	0101				0101/04/05	0501	0103	0201
HL60	0101	5701	nd	0701		0101/03/0 6		0201	0303	0103. 0201	0201, 1301

del; deletion, nd; not determined

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 178 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とほぼ同程度であった。

参加施設名

札幌北楡病院, 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, 日本赤十字社中央血液センター, 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, 株式会社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 2 ラボ, 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, 国立病院機構千葉東病院, 千葉県赤十字血液センター, 自治医科大学附属病院, 埼玉医科大学附属病院, 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, 大阪赤十字血液センター, 大阪府立急性期・総合医療センター, 国立循環器病センター, 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, 広島大学病院, 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, 愛媛県立衛生環境研究所, 福岡大学医学部腎センター, 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, 佐賀中部保健所, 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, 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附属病院, 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, Torrey Pines Institute for Molecular Studies (以上 77 施設, 郵便番号順)

表 3 PCR ソースとなった細胞株の HLA 型

Cell ID	A	B	C
JVM	0201		
KAS	2402	5101	
WDV		3801	
SPO0101			0501
H104			0702

表 4 QCWS サンプルの構成

ID	形状	構成
H1601	DNA	A549
H1602	DNA	THP-1
H1603	DNA	LCL721.221 にクラス I 遺伝子 PCR 産物を混合。 PCR 差物は以下の通り A(全 exon を含む LA-PCR 産物)は JVM と KAS 由来 B(全 exon を含む LA-PCR 産物)は WDV と KAS 由来 C(exon 2, 3, 4 それぞれの PCR 産物)は SPO0101 と H104 由来
H1604	DNA	THP-1 と HL60 を 9:1 で混合
H1605	cell	THP-1 と HL60 を 1:9 で混合
H1606	cell	A549

5. まとめ

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、昨年度に引き続き、認定制度の主旨にそった試料の構成や選択を行い、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。また、あらかじめ解析資料を CDR で送付することによって、参加者が全体解析の結果も集会前に知ることを可能とした。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 8 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) 日本薬科大学生物学, 5) 国立病院機構千葉東病院 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

QC ワークショップは前回から方向転換を計り、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。また、倫理面への配慮から使用されるサンプルもセルライン由来の DNA や PCR プロダクトが主体となっている。検査結果は 100% の正解を望まれるところであるが、異常なサンプルに対しどのように判断を下すか、どのように伝えるかを考えなければならない。本稿「クラス I データ正解率」では、異常サンプルは除外し、正常サンプルでどの程度の正解率が得られているか、Low resolution および High resolution で検討した。

2. 検討方法

以下の要領にて検討した。

2.1. 検討種目

- 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)

2.2. 検討総数

- 1) A, B ローカス: 69 施設分
- 2) C ローカス: 41 施設分

2.3. 除外検体

- 1) H1604, H1605
- 2) H1603 の C ローカス: Cw*0102 も検出されたため
- 3) 「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もの

2.4. 集計方法

- 1) 「総合判定」を集計対象とした。
- 2) Low resolution の集計:
A, B ローカスは遺伝子型で 2 桁か HLA (抗原対応)型が記入されている場合。
C ローカスは遺伝子型が 2 桁で記入されている場合。
- 3) High resolution の集計:
遺伝子型が 4 桁表記以上で記入されている場合。

表1 サンプルおよびローカス別正解率

QC ID	HLA型	遺伝子型	Low resolution			High resolution							
			報告数	正解数	正解率	Others	未記入	報告数	正解数	正解率	Others	未記入	
A*	H1601	A25 A30	2501 3001	66	65	98.5%	A-25, A-30	3	53	53	100%	-	-
	H1602	A2 A24	0201 2402	65	62	95.4%	A-2, A-24, 02, .02	2	50	50	100%	-	2
	H1603	A2 A24	0201 2402	65	63	96.9%	A-2, A-24, 02	2	50	49	98.0%	0206/10/20+	2
	H1606	A25 A30	2501 3001	51	50	98.0%	24	3	47	45	95.7%	2402/20, (Blank), 3011	15
				247	240	97.2%			200	197	98.5%		
B*	H1601	B18 B44	1801 4403	66	61	92.4%	B*35, 35, B-18, 15, B-44, 62	3	51	48	94.1%	1809,1815, 1501/03/05/+, 1546/53	-
	H1602	B75 (B15) B35	1511 3501	65	64	98.5%	B-35, B-15	3	51	48	94.1%	1508, B*1508, 3511/21	1
	H1603	B51 B38	5101 3801	65	62	95.4%	B-38, 39, B-51, 51	2	50	47	94.0%	3802/08, 3901/05/+, 5106, 5121 1809,1903,	2
	H1606	B18 B44	1801 4403	50	46	92.0%	B35, 75, 62, 15	3	44	41	93.2%	1501/03/05/+, 1546/53	16
				246	233	94.7%			196	184	93.9%		
Cw*	H1601	12 16	1203 1601	15	9	60.0%	*06/17, (Blank), *17, 06/12,	-	25	22	88.0%	1604, (Blank)	3
	H1602	Cw9 -	0303 -	12	10	83.3%	3, HLA-Cw9	-	24	21	87.5%	0102, 0301/03, Cw*0304/06	5
	H1603	Cw5 Cw7 Cw1	0501 0702 0102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H1606	12 16	1203 1601	6	2	33.3%	Cw*06, (Blank)	-	19	15	78.9%	1604, (Blank)	16
				33	21	63.6%			68	58	85.3%		
				526	494	93.9%			464	439	94.6%		

表2 対立遺伝子型別正解率

	遺伝子型	Low resolution			High resolution			Others
		報告数	正解数	正解率	報告数	正解数	正解率	
A*	0201	130	125	96.2%	100	99	99.0%	0206/10/20+, A-2, .02, 02
	2402	130	128	98.5%	100	100	100%	A-24
	2501	117	115	98.3%	100	99	99.0%	2402/20, A-25, 24
	3001	117	115	98.3%	100	98	99.0%	3011, A-30, (Blank)
		494	483	97.8%	400	397	99.3%	
B*	1801	116	109	94.0%	95	89	93.7%	1815, B-18, 75, 62, 1501/03/05/+, 1809, 1503, B35, 35
	1511	65	64	98.5%	51	49	96.1%	1508, B*1508, B-15
	3501	65	64	98.5%	51	50	98.0%	3511/21, B-35
	3801	65	62	95.4%	50	47	94.0%	3802/08, 3901/05/+, 5106, B-38, 39, 51
	4403	116	112	96.6%	95	92	96.8%	1546/53, (Blank), B-44, 15
	5101	65	64	98.5%	50	49	98.0%	5121, B-51
		492	475	96.5%	392	376	95.9%	
Cw*	0303	12	10	83.3%	24	21	87.5%	0102, 0301/03, C*0304/06, HLA-Cw9, 3
	1203	20	19	95.0%	45	45	100%	*17
	1601	21	11	52.4%	44	37	84.1%	1604, *06/17, 06/12, Cw*06, (Blank)
		53	40	75.5%	113	103	91.2%	
		1,039	998	96.1%	905	876	96.8%	

- 4) 「サンプル別」および「検査法別」集計においては、両対立遺伝子型とも正解した場合のみ、正解とした。

3. 結果および考察

「サンプルおよびローカス別」の正解率は前回同様90%台の数字を得ており、高水準の結果を維持している。そこでもみられたがLow resolutionの正解率がHigh resolutionを下回るケースがあった。不正解となる要因の多くは表記ルールの逸脱である。中

でもHLA(抗原対応)型の表記で「A-24, B-35」など余計な「-」を入れた施設があり不正解とした。なお、この施設は遺伝子型では正解しており、これも、Low<Highという結果に影響を与えている(表1)。また、表には示していないがアミノ酸同義置換を5桁目と6桁目で表記することは、ほぼ浸透したといえる。

「対立遺伝子型別」ではA, Bローカスともに90%台後半の正解率で対立遺伝子単独でみるとほとんど間違えていないことが理解できる。しかしながらC

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	207	185	89.4%	154	148	96.1%	
	SSO	398	383	96.2%	359	337	93.9%	
	SBT	36	36	100%	60	59	98.3%	
	RSCA	6	6	100%	6	6	100%	
	SSCP	3	3	100%	3	3	100%	
	RFLP	1	1	100%	4	3	75.0%	
		651	614	94.3%	586	556	94.9%	
1法	SSP	122	105	86.1%	73	72	98.6%	
	SSO	283	273	96.5%	252	234	92.9%	
	SBT	-	-	-	18	18	100%	
	RSCA	4	4	100.0%	4	4	100%	
	RFLP	-	-	-	3	2	67.0%	
			409	382	93.4%	350	330	94.3%
2法	SSP	SSO	75	70	93.3%	66	62	93.9%
		SBT	-	-	-	5	4	80.0%
		RSCA	2	2	100%	2	2	100%
	SSO	SBT	28	28	100%	29	29	100%
		SSCP	4	4	100%	4	4	100%
		RFLP	1	1	100%	1	1	100%
		110	105	95.5%	107	102	95.3%	
3法	SSP+SSO+SBT	8	8	100%	8	8	100%	
		8	8	100%	8	8	100%	

ローカスの正解率が低く、特に Cw*1601 の Low resolution では 52.4% の正解に留まり、これが全体の正解率をやや低下させた原因となっている(表2)。

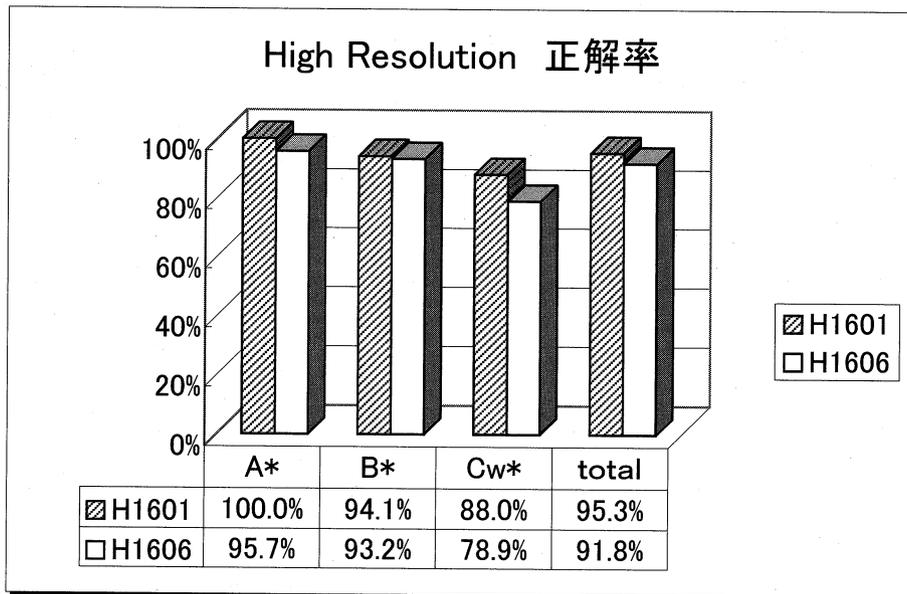
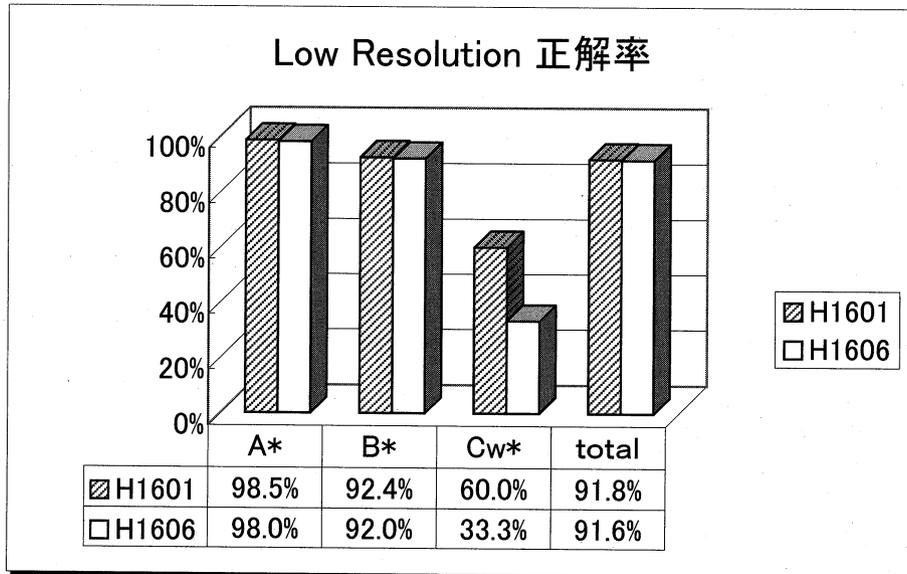
「検査方法別」では検査方法数の増加にともない正解率は高くなっているが、1法と2法でほとんど差がない。なかでも、SSPとSBTの2法で、しかもSBT試薬も2種類使用していながら間違えている施設があり問題である。これはH1602のCローカス部分でCw*0303ホモが正解とみられるが、Cw*0303, Cw*0102と回答していた(表3)。

以上、各検討種目以外では、同一サンプルでありながらDNA溶液であるH1601と細胞附着ろ紙であるH1606の比較において、後者がやや正解率が低い結果となっている。やはり、CローカスのLow resolutionは顕著に低下している(グラフ)。

この結果はQCワークショップ主要テーマである、さまざまな状況のサンプルにどのように対応すべき

かという点において、ひとつの問題提起がされたとみるべきである。形態の異なる同一サンプルで容認できる正解率の差とはどの程度なのか、本来差があってはならないことではないだろうか。その要因は、DNA抽出技術の違いによるものか、各検査試薬のPCR効率の差であるのか、さまざまな要素が考えられ、この数パーセントの差が各施設間の対応力を表すスケールとも考えられる。

さらに拡大して考えると全体の正解率90%台という数字に満足していいものなのか。ここでやっている方法は遺伝子タイピングであるから、本来100%の正解率でないといけないのではないだろうか。ここで得た数字は単なるワークショップ・データに過ぎないが、実際に日常行う遺伝子タイピングが研究データであろうと臨床に報告するデータであろうと1%の間違ひもあってはならないはずである。そして、どのように100%に近づけるかがこのワークショップに参加する者全員の課題であると考えられる。



	QC ID	Low resolution			High resolution		
		報告数	正解数	正解率	報告数	正解数	正解率
A*	H1601	66	65	98.5%	53	53	100.0%
A*	H1606	51	50	98.0%	47	45	95.7%
B*	H1601	66	61	92.4%	51	48	94.1%
B*	H1606	50	46	92.0%	44	41	93.2%
Cw*	H1601	15	9	60.0%	25	22	88.0%
Cw*	H1606	6	2	33.3%	19	15	78.9%
total	H1601	147	135	91.8%	129	123	95.3%
total	H1606	107	98	91.6%	110	101	91.8%

グラフ H1601 と H1606 の正解率の比較

第8回 HLA-QC ワークショップレポート —HLA-Class II 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) 日本薬科大学生物学, 5) 国立病院機構千葉東病院 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

今回配布されたサンプルとそのソースとなった細胞株の HLA-class II type を表 1 に示す。

- (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?

今年度は4種の細胞株をもとに6種のサンプルが作成され配布された。テーマ(1)の評価のため、日本人集団において一般的な HLA-class II 抗原を保有する2種の DNA 溶液 (H1602, H1603) が配布された。テーマ(2)の評価のため、人為的に2種の細胞株 (THP-1, HL60) 由来の DNA または細胞が相補的な割合 (9:1, 1:9) で混合され、DNA は溶液 (H1604) で、細胞はロシ付着サンプル (H1605) として配布された。テーマ(3)の評価のため、同一細胞株を用い、細胞より抽出した DNA 溶液 (H1601) と細胞をロシに滴下したサンプル (H1606) が配布された。

2. 参加施設

HLA-DRB1 について 73 施設, HLA-DRB3/4/5 について 34 施設, HLA-DQB1 について 31 施設, HLA-DQA1 について 4 施設, HLA-DPB1 について 1 施設からデータの提出があった。

3. HLA-class II タイピングの評価方法

HLA-class II タイピング結果の正誤判定は、Low Resolution Typing と High and Middle Resolution Typing 別に、H1601, 1606, 1602, 1603 について、参加施設が多い HLA-DRB1 と DQB1 につき行った。また混合サンプルである H1604, 1605 について、どのような実験結果が得られるか、その結果に基づき Tissue typer が判定した結果について、Low Resolution Typing と High and Middle Resolution Typing 別にまとめた。

4. HLA-class II 総合評価結果

表 2 にサンプル, H1601, H1606, H1602, H1603 について、HLA-DRB1, -DQB1, -DRB3/4/5 の Low Resolution type および High and Middle Resolution type の一致率を示す。

4-1. HLA-DRB1

- 1) 正確なタイピングができるか?

対象サンプル: H1602, H1603

Low Resolution

参加施設数: 62

両サンプルの正解率は 100% であり、タイピング法として、PCR-SSO または SSP 法で十分タイプできる。

☆ 抗原レベルのタイピングはどのような方法を用いても正確なタイピングが実施されていた。

表1 8QCWの配布サンプルリストおよび使用された細胞株とそのHLA-class II Type

サンプルデータ HLA-class II Type

キ ン 色	ヤ ブ 名 称	形 態	濃 度	容 量	ソ ン ヌ な っ た 細 胞 株	DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQA1	DQA1	DQB1	DQB1
緑	H1601	溶液	50ng/ μ l	150 μ l	A549	0701	0202/ 12	0101/ 03/06		0201	0501/0 3/05	0201/ 02	0301/ +
橙	H1606	ろ紙	100,000 細胞/枚	2枚	A549	0701	0202/ 12	0101/ 03/06		0201	0501/0 3/05	0201/ 02	0301/ +
黄	H1602	溶液	50ng/ μ l	150 μ l	THP-1	0101 1501		0101	0101	0101/0 4/05	01012/ 03	0602/ 11/20	0602/ 11/20
青	H1603	溶液	50ng/ μ l	150 μ l	LCL721.22	0101				0101/0 4/05		0501	
赤	H1604	溶液	50ng/ μ l	150 μ l	THP-1=9 HL60=1	0101 1501			0101	0101/0 4/05	01012/ 03	0602/ 11/20	0602/ 11/20
紫	H1605	ろ紙	100,000 細胞/枚	2枚	THP-1=1 HL60=9	0101 1501			0101	0101/0 4/05	01012/ 03	0602/ 11/20	0602/ 11/20

High and Middle Resolution

参加施設数: 55

H1602, H1603 共に正解率99%で, PCR-SSP法を用いた1施設にミスがあった。

High Resolution Typing に適したタイピング法とは?

19施設が High Resolution typing 結果を提出し, 正解率は100%であった。使用されたタイピング法を分析すると,

- 7施設は SBT 法とその他の方法のコンビネーション
- 10施設は SBT 法以外の方法を2種以上使用
- 2施設は SSO のみ

☆ キット使用上の注意点: 単一方法 (PCR-SSO 法)のみで4桁をタイプした Lab が使用したキットと同一キット(ジェノサーチ HLA-DR, Dynal RELI)により, 他18施設は Middle Resolution 結果で判定していた。これは使用キットの検出限界の認識の違いによる相違と考えられる。組織適合性検査者は, 使用するキットの検出限界を正しく把握し, 判定を正確に行うことが肝要である。

☆ High Resolution typing を行うには, タイピング法別の検出限界を熟知し, その組み合わせにより4桁でのタイピング結果を得ることが可能である。

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 H1604, H1605 は以下のような混合比率で人為的に作成され, 混合物であることはコメントされず配布された。

H1604 = THP-1 (90%) + HL60 (10%)

…DNA 混合溶液

H1605 = THP-1 (10%) + HL60 (90%)

…細胞を濾紙に付着

THP-1: HLA-DR1, DR15, HL60: HLA-DR7, -したがって H1604 は major type (90%) が (DR1, DR15), minor type (10%) が (DR7) と推定され, H1605 は major type (90%) が (DR7) で minor type (10%) が (DR1, DR15) と推定されるサンプルである。

Low Resolution

参加施設数: 64

〈解答の分類〉

H1604: DNA 溶液

- 1) 判定不能: 28施設 (3抗原検出の為)
- 2) Triplet 判定 (DR1, 15, 7): 21施設
- 3) Major type (DR1, DR15) のみを解答した: 14施設
- 4) Major type をミスし minor type (DR7) を検出: 1施設

各解答別に使用されたタイピング方法に偏りは認

表2 HLA-DRB1, -DQB1, -DRB3/4/5 における Low Resolution type・High and Middle Resolution type の一致率

	HLA-DRB1		HLA-DRB345		HLA-DQB1	
	Low	High /Middle	Low	High /Middle	Low	High /Middle
	N=61	N=55	N=34	N=19	N=31	N=22
H1601	98%	87%	94%	89%	100%	保留
H1606	93%	82%	94%	94%	100%	保留
H1602	100%	99%	97%	100%	100%	95%
H1603	100%	99%	97%	100%	100%	100%

保留: reference の解答が DQB1*0201/02, 正確なアリル決定がなされていない

められなかった。

H1605: ロシ付着細胞

- 1) 判定不能: 18 施設 (3 抗原検出の為)
 - 2) Triplet 判定 (DR1, 15, 7): 12 施設
 - 3) Major type (DR7) のみ検出: 4 施設 (PCR-SSO 法)
 - 4) Major type と minor type である DR1 または DR15 の片方のみを検出: 20 施設 (DR1 は 14 施設で検出された。検出方法による偏りは見られなかった)
 - 5) Major type および minor type (DR7) とは異なる抗原を検出: 2 施設
 - 6) minor type (DR7) のみ検出: 1 施設
 - 7) タイピング不能: 7 施設
—少量サンプル(ロシ付着細胞)のタイピング—
PCR-SSP 法は第 7 回 QCW で少量サンプルのタイピングには適さないとされた。この方法のみを用いた 17 施設の解答を分類すると、
 - 1) 6 施設: タイピング不能
 - 2) 3 施設: 3 抗原が検出され判定不能
 - 3) 3 施設: Major type (DR7) と minor type (DR1, DR15) のうちどちらか一方のみ検出
 - 4) 1 施設: Major type (DR7) と minor type とは別のタイプを検出
- ☆ PCR-SSP 法を日常検査法として用いる Tissue

Typer のほぼ半数は、昨年の QC の結論を反映しタイピング不能と適切な判断をしていた。

☆ タイピング結果を提出した施設の成績からも、微量サンプルの場合、たとえ抗原レベルのタイピングでも PCR-SSP 法を用いることはあまり適さないことがわかる。

High and Middle resolution typing

参加施設: 61

〈解答の分類〉

H1604: DNA 溶液

- 1) 判定不能: 27 施設 (3 アリル検出の為)
- 2) Triplet 判定: 17 施設
- 3) Major type (DRB1*0101, DRB1*1501) を解答: 16 施設
- 4) Major type と minor type ではないアリルを検出: 1 施設

H1605: ロシ付着細胞

- 1) 判定不能: 23 施設
- 2) Triplet 判定: 12 施設
- 3) タイピング不能: 4 施設
- 4) Major type (DRB1*0701) を解答: 3 施設 (記載ミス 1 施設)
- 5) Major type (DRB1*0701) および minor type (DRB1*0101, DRB1*1501) のどちらか一方のみ検出: 9 施設

- 6) Major type (DRB1*0701) と minor type を DRB1*0106/ とし検出: 7 施設(タイピング方法として SBT を含む)
- 7) Major type (DRB1*0701) と minor type (DRB1*0101, DRB1*1501) 以外のアレルを検出: 1 施設
- 8) Major type (DRB1*0701) はミスし, minor type を検出: 2 施設

使用されたタイピング方法による特殊な偏り傾向はなかった。

—少量サンプル(ロシ付着細胞)のタイピング—

☆ Low Resolution の場合と同様, 昨年の QCW で得られた結論を補強する結果であった。

☆ 多施設の Tissue Typer が人為的に混合されたサンプルで, かつ事前にキメラの可能性のあることを知らされていない場合, 判定不能 (Triplet のため, 検体を取り直し再検査要) と解答している。正確なタイピングを行うことが目的である組織適合性検査者として, 誠にすばらしい解答である。

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?

昨年同様, 微量サンプルとしてロシ付着細胞によるサンプルが配布された。ただし今回は同じ細胞由来の DNA 溶液が同時に配布された。

Low Resolution

参加施設数: 61

DNA 溶液で配布された H1601 の正解率は 98%, ロシで配布された H1606 の正解率は 93% であった。

—PCR-SSP 法のみを用いたタイピングは可能か?—

7QCW で微量 DNA には適さない方法とされた PCR-SSP 法であるが, この方法のみを用い解答した施設 (13) のうち 10 施設 (77%) はタイピング不能と解答した。残り 3 施設 (21, 23, 28) はタイピングを実施し, 3 施設とも正解であった。

☆ 前回の QCW の結果に基づき, 微量 DNA サンプルには不適当な方法と適切な判断がなされていた。

☆ 微量なサンプルであるが, PCR-SSP 法で 3 施設とも正解であった。特別な工夫があるのかもしれない。

High and Middle Resolution

参加施設数: 55

H1601 の正解率は 87%, H1606 の正解率は 82% であり, Low Resolution の正解率に比べ若干低下していた。

それぞれのサンプルでの過誤を以下に分類する。

H1601: 7 施設が不正解

- 1) 記載ミス <*070101/02 または *07>; 3
- 2) DR11 のアレルをミスタイプ; 4 施設(同じメーカーのキット使用)

H1606: 10 施設が不正解

- 1) 記載ミス <*070101/02 または *07, 11>; 4
- 2) DR11 のアレルミスタイプ; 6 施設中 4 施設は同じメーカーのキット使用)

—PCR-SSP 法のみを用いたタイピングは可能か?—

Row Resolution の場合と同様, PCR-SSP 法のみを用い解答した施設が 8 施設あり, そのうちの 7 施設 (88%) はタイピング不能と判断され, 残り 1 施設が解答したが不正解であった。

☆ 微量サンプルでの High and Middle Resolution タイピングには PCR-SSP 法は不相当であることが再確認された。

—High Resolution typing のためのタイピング法とは—

参加施設のうち 12 施設が 4 桁で結果を提出し, その正解率は 83% であった。以下に参加施設のタイピング法をまとめる。

- 1) PCR-SSO 法単独で解答…4 施設
3 施設が同一のキット**を使用し正解
1 施設は DR11 のアレルミスタイプ
- 2) 2~4 種の方法を組み合わせ解答…8 施設
7 施設が正解, 1 施設が DR11 のアレルミスタイプ
- 3) PCR-SBT 法ともう 1 法で 4 桁タイピングを行った 6 施設は記載ミスを見れば, 全施設正解であった。

☆ **項目 1 で見られた現象と同じ現象がみられた。すなわち同一キットで同一ロットを使用している参加施設が複数あり, 大多数は Middle Resolution の結果を出し, 一部の施設だけが 4 桁の結果を出し

ている。組織適合性検査者のうち初心者が陥り易いミスである。使用するキットの検出限界を熟知し、結果の判定を正確に行わなければならない。

☆ タイピング方法別の検出限界を熟知し、その組み合わせにより4桁でのタイピング結果を可能にすることが昨年と同様に確認された。

☆ 昨年はPCR-SBT法によるタイピングにおいても過誤が生じていたが今年はこの方法を用いることにより正確な結果が得られるようになった。

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2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よりみられる問題点は、日常使用するキットの自動判定による結果を鵜呑みにした判定は過誤を犯す可能性がある。検出限界を熟知した上での判定を行うことが重要である。

第8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⁾, 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) 国立病院機構千葉東病院 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) 日本薬科大学生物学, 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
大学院疾患生命科学部ゲノム多様性研究室, 10) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野

1. 検体の特徴と狙い

今回も6種類のサンプルが提供された。細胞株由来の抽出 DNA, PCR 産物などの人工的に混合された DNA, あるいは、2種類の細胞株を混合したものを DNA の形状あるいは細胞のままろ紙に添付したものが配布された。目的1として正確なタイピングと正確な記載, 目的2としてキメラまたはコンタミネーションを想定した場合 (H1604 と 1605) の対応, 目的3としてろ紙添付した微量検体 (H1605, 1606) から正確なタイピングが得られるかどうかであった。PCR-SSO 法では PCR-SSP 法と異なり PCR 開始時のテンプレート DNA 量にほぼ比例してジェネリクな 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 (H1604, H1605 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. PCR-SSO キットの使用状況と解析方針

今回の精度管理における PCR-SSO 法の使用採用は参加 72 施設中, 51 施設 (70.8%) に認められた。昨年よりも増加しているのは微量検体にも対応できる PCR-SSO 法を採用した施設が増加したためと思われる。表1に示すように SSO 法のみ使用した施設が1種類または複数使用を合わせて26施設 (51%) であり, その他の施設では SSO 法以外方法を併用していた。メーカー別ではダイナル社製キットを採用している施設が最も多く, 昨年に比べてゲノムサイエンスのキットを採用した施設の増加が見られた (表2)。それに伴いビーズ法が増加していた

表 1

方法	数	パーセント
SSO (1種) 単独	24	47.1
SSO (複数) 単独	2	3.9
SSO+SSP	11	21.6
SSO+SSP+SBT	2	3.9
SSO+SSP+SSCP	2	3.9
SSO+SSP+RFLP	2	3.9
SSO+SSP+RFLP+SSCP	1	2
SSO+SBT	3	5.9
SSO+SBT+RFLP	1	2
SSO+RFLP	2	3.9
SSO+SSCP	1	2
SSO施設数	51	100

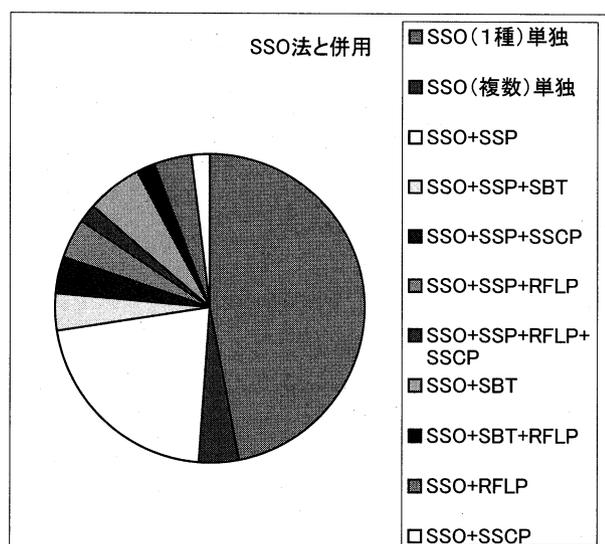


図 1

(表 3)。

タイピング結果や記載については他の分担報告者が行うので、ここでは各プローブの陽性・陰性反応状況を中心に解析を進めた。解析に際してできるだけ多くの施設が採用しているダイナルリライとワクナガ MPH-2 (以後 MPH と略す) キットを対象とした。ダイナルリライキットにおいては最新のロットになるにつれプローブ数が増加しているのので、古いキットのプローブが新しいキットのどのプローブに対応するかを決めて解析を実施した。ダイナルリライキットではすべて発色強度を血清法のスコアに準じて 1, 2, 4, 6, 8 で報告していたがワクナガ MPH キットでは OD 値やスコアでの報告であったので、比較するために解析では陽性、陰性のみ注目し、

表 2

メーカー別 (複数使用あり)

メーカー名	数	パーセント
ダイナル	28	54.9
湧永	13	25.4
ゲノムサイエンス	9	17.6
ワンラムダ	5	9.8
イノジェネ	3	5.9
SSO施設数	51	100

表 3

施設使用方法	数	パーセント
ストリップ	31	60.8
トレイ	13	25.4
ビーズ	13	25.4
SSO施設数	51	100

陽性判定の中でのシグナル強度(スコアの大小)については除外した。

3. 同一特異性検体のテンプレート濃度の反応性への影響

検体 H1601 と H1606 では同じ特異性の検体であるが、後者ではろ紙にサンプルが添付されていたので、テンプレート量が極端に少ないと考えられる。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が、実際に微量な検体に対してでも完全に検出できるという結果になるのであろうか、またキット間では違いが見られるのであろうか。

H1601 と H1606 のプローブ別の反応とリライと MPH キットそれぞれについて HLA-A, HLA-B, HLA-DR ごとに結果を表 4, 5, 6 にそれぞれ示した。実際に使用している総プローブ数はメーカーにより異なっている。キットにより陽性に反応するプローブ数も異なっているが、HLA-A, B, DR おいて、総じてリライのキットでは H1601 に比べて H1606 の検体の場合にも強い反応が得られ特異性がアサインされているが、MPH キットでは H1606 検体では大

表 4-1

HLA-A座分析

リライ

プローブ#	陽性率%	
	H1601	H1606
	n=27	
1*	100	100
2	100	81
4	100	96
5	100	93
9	100	96
10	100	89
11	100	100
12	100	96
14	100	96
17	100	89
20*	100	83
22	100	85
27	100	46
30	100	81
32	100	81
34	100	100
36	100	96
38*	100	100

*,n=18

表 4-2

MPH

プローブ#	陽性率%	
	H1601	H1606
	n=11	n=10
2	91	70
3	73	10
5	91	40
13	100	80
17	100	80
18	91	50
20	100	90
21	91	60
24	100	80

表 5-1

HLA-B座分析

リライ

プローブ#	陽性率%	
	H1601	H1606
	n=27	
3	100	100
6	100	93
8	100	93
10	100	96
13	100	100
14	100	96
15	100	100
18	100	100
25	100	93
28	100	100
30	100	96
31	100	100
43	100	100
46	100	93
48	100	100
52	100	93
53	100	100
56	100	100
57	100	96
58	100	96

表 5-2

MPH

プローブ#	陽性率%	
	H1601	H1606
	n=11	n=10
1	100	90
2	100	100
3	100	90
4	82	60
8	91	90
9	91	90
13	100	80
14	91	60
15	91	50
17	91	90
20	91	70
21	100	80
22	82	70
23	100	80

表 6-1

HLA-DR座分析

リライ

プローブ#	陽性率%	
	H1601	H1606
	n=27	
3	100	93
5	100	96
9	100	93
14	100	93
18	100	93
21	100	100
24	100	93
32	100	85

*,n=18

表 6-2

MPH

プローブ#	陽性率%	
	H1601	H1606
	n=8	n=6
3	88	0
6	100	83
11	88	0
21	100	50
24	100	83

きな影響を受け反応性の低下が認められ特異性がアサインされにくくなっていた。どちらのキットでもすべてのプローブ(部位)が一律に影響を受けるのではなく、影響を受けにくいプローブ部位、受けやすいプローブ部位があった。これらの影響を推測するとテンプレート量(PCR産物の量)と、プローブの量や長さ、AT, GC リッチなどの組成が総合的に影響していると考えられる。すなわち結合力の強いプローブではPCR産物が少なくなっても陽性と判定されやすいが、結合力の弱いプローブではPCR産物が少なくなると結合するプローブが減少し判定が陰性化するためであろう。

4. キメラあるいはコンタミネーションを模した検体への対応

今回の精度管理におけるH1604とH1605ではひとつの遺伝子座に3つの特異性が検出されるという異常な検体であった。結果報告では一般的にはこのような検体に対しては再検査(検体の再採取)が必要な検体であり、多くの参加施設がこの点を指摘し判定不能などと正しく行っていた。2つの異なった特異性の細胞株を混合していたが、H1604とH1605では混合割合が逆になっていて陽性に反応する個々のプローブの割合がどのようになるかが注目点であった。さらにH1605検体はろ紙からの抽出操作が加わるので、微量な検体という要因が加わっている。表7-9ではH1604とH1605の検体でどちらの検体でも強く反応すると予測されるものは $=$ で表示しH1605に比べH1604で強く反応すると予測されるものは $>$ で表示し、弱く反応すると予測されるものは $<$ で表示した。nは参加施設数で数字が異なるのは検体により検査を実施しなかった施設があるため、陽性率は陽性とした施設パーセントである。表7-9において反応予測で $>$ のプローブにおいてはH1605のテンプレートがろ紙サンプルで少ない上に混合割合も少ないことからさらに微量になっていると考えられた。H1601とH1606でもH1604とH1605でも反応する共通プローブが存在するが、テンプレートが少なくなると影響を受けるプローブではテンプレート量がさらに微量になるとリライであろうとMPHであろうと大きく反応性が低下した。一方、こ

のような状況下でも強く発色し続けるプローブあった。通常の検体ではテンプレート量が一定の範囲内であれば陽性を陰性と取り違えることは少ないが、テンプレート(PCR増幅産物)が少ないような検体に直面したときは個々のプローブの特色を熟知した上で判定をすれば誤判定が少なくなると思われる。リライとMPHを比較すると総じてリライのほうが影響を受けにくいことが示された。

5. まとめ

大多数の施設では通常の濃度の検体に対して偽陰性や偽陽性が少なく正確にプローブの陽性・陰性を判定していた。成績も満足行くものと考えられた。リライキットの使用施設では各施設に配布したキットごと検体ごとの比較生データに示されるようにスコアの大小についても極めてよく一致していた。一方、2-3の施設では偽陰性や偽陽性が多く、正確にアサインしていない施設があったので、今後もそのキットを使用するのであればこれらの施設では習熟する必要がある。

微量テンプレート検体に対してはすべてのプローブが一律に影響を受けるのではなく、ほとんど影響がないものから、陰性と判定されるプローブまで含まれていた。テンプレート量によりプローブの反応性が大きく影響を受けるキットがあり使用者も注意する必要があるとともに、より広いテンプレート濃度に対応できるようにメーカー側も改良する必要がある。

キメラあるいはコンタミネーションを模した検体についてはほとんどの施設が異常検体であることに気づき正確に指摘した。SSO法では微量混入した検体の特異性を正確に同定するのは困難であり、方法としての限界がある。キットに付随している判定ソフトでは一遺伝子2つまでの特性が得られるようになっているのでこのような検体では判定不能という答えが返ってくるが、1プローブ設定部位に3つ以上の陽性プローブ反応が見られるようなときはプローブの特性を加味してキメラの可能性なども指摘するようなソフトの改良があってもよいと思われる。

キメラ検体などでは混合割合によっても得られる結果が異なってくる。昨年ではホモザイゴウトを

表 7-1

HLA-A座分析

リライ

プローブ#	反応性 予測	陽性率%	
		H1604	H1605
		n=27	
1	>	100	37
3	=	100	100
5	<	88	100
6	>	100	37
7	>	100	16
11	=	100	100
13	>	100	42
15	<	76	100
16	>	94	5
22	<	71	95
23	>	100	37
25	=	100	100
26	>	100	53
30	>	100	11
31	>	100	16
34	<	100	100
36	>	100	42
38	>	100	16
39	=	100	100

表 7-2

MPH-2

プローブ#	反応性 予測	陽性率%	
		H1604	H1605
		n=11	n=10
1	=	100	100
4	>	91	0
6	>	91	20
8	>	91	0
9	<	55	80
10	>	91	0
11	>	100	10
14	>	100	10
16	=	91	100
19	>	91	0
20	>	91	10
21	<	82	100
23	=	91	100
24	>	91	40

表 8-1

HLA-B座分析

リライ

プローブ#	反応性 予測	陽性率%	
		H1604	H1605
		n=28	
6	=	100	100
8	>	100	36
9	=	100	100
15	>	100	96
16	>	89	0
21	<	89	100
27	<	68	93
28	>	100	89
30	>	100	14
31	>	100	89
34	<	100	96
43	=	100	100
48	=	100	100
51	>	100	29
53	=	100	100
56	=	100	100

表 8-2

MPH

プローブ#	反応性 予測	陽性率%	
		H1604	H1605
		n=11	n=10
1	=	100	100
4	>	64	20
6	=	91	60
9	>	91	70
10	=	91	80
13	>	100	20
14	>	100	10
15	<	91	90
17	>	91	20
20	=	9	90
21	=	91	100
23	=	82	90

表 9-1

HLA-DR座分析

リライ

プローブ#	反応性 予測	陽性率%	
		H1604	H1605
		n=27	
1	>	100	78
2	>	100	41
5	<	74	100
11	>	100	52
16	>	100	56
18	<	48	93
21	<	93	100
30	>	96	74
36	>	96	74

表 9-2

MPH

プローブ#	反応性 予測	陽性率%	
		H1604	H1605
		n=8	n=6
1	>	100	0
2	>	100	0
6	<	88	100
10	>	88	17
17	>	88	0
18	>	88	0
20	>	100	0
24	<	75	83

1:1 に混合した場合には何の問題もなく SSO 法でもヘテロとしてタイピングしていた。今回は 1:1 の混合ではなくヘテロの検体がより日常でもありえる 1:10 のキメラ割合、あるいはコンタミネーション

濃度であったために、PCR-SSO 法と PCR-SSP 法では異なった結果が得られている。用いるキットの種類に応じてどのように結果が異なるかを理解しておくことが大切である。

第 8 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) 日本薬科大学生物学, 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) 国立病院機構千葉東病院 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

PCR-SSP 法の解析は、キット別を実施した。また、採用している施設が 2, 3 施設しかないようなキットについては、解析から除外した。なお、HLA-C 遺伝子座については事前にサンプルのアリルが判明していなかったことから、解析の対象から外した。ただし、アリルが明らかになっているものについては一部を解析対象とした。

2. Micro SSP Japanese Class I and Class II ABCDRDQ DNA Typing Tray (Micro SSP JPN) (図 1)

サンプル H1601 について Micro SSP JPN キットで、本来 HLA-A 遺伝子座の判定を 2 桁レベルの粗分別では HLA-A*25/26/43+ としなければならないところ、HLA-A*25, HLA-A*24/43/66, HLA-A*25/26/43 というような判定が 9 施設中 5 施設にみかけられた。また、4 桁レベルの細分別においても HLA-A*2501/2606/+ としなければならないところ、HLA-A*2501/02/03/+ と判定した施設が 2 施設みかけられた。さらに、もう一つのアリルである HLA-

A*3001 については「検査結果(ワークシート)記載法と結果報告書表記法の原則(2003 年度版)」が遵守していない判定(A*3001/3002-07/+)が一施設で見受けられた。サンプル H1601 について Micro SSP JPN を使用して実施した施設において何らかの判定ミスが 9 施設中の 8 施設にみかけられた。昨年の QC ワークショップにおいて学会が推奨している「表記法の原則」が守られていない施設が多くみかけられたが、この点について今年の QC ワークショップ参加施設ではかなりの改善がみうけられた。

サンプル H1603 について 9 施設中の 3 施設において本来陽性反応を示さないはずの HLA-A*03, A*3204, A*3602 アリルを増幅するプライマーセットがスコア 4 から 6 の陽性反応を示していた。判定上、問題になっていないようであったが、プライマーの設計を再考する必要があるものと思われた。また、HLA-C 遺伝子座については HLA-Cw*0702 アリルを 9 施設中 3 施設で増幅できていなかった。このアリルの増幅には 2 種類のプライマーセットが使用されているにもかかわらず、何れもが陰性反応を示していた。また、その反応性も弱いことから、

早急な改善が必要とされるものと思われる。

HLA クラス II アリルについては、何れのサンプルについてもほとんど問題のない反応性を示していた。ただし、上述と同様な表記ミスや判定ミスが多く、施設でみかけられた。

昨年度と同じロットが多く、施設で使用されているにもかかわらず、サンプルの反応性はかなりの改善がみられたが、相変わらず表記ミスや判定ミスが多く、表記法のさらなる理解と判定時の注意が必要と思われた。

3. Micro SSP Generic HLA Class I DNA Typing Tray (Micro SSP 1L) (図 2)

サンプル H1601 と H1603 で転記ミスと思われる反応結果の書き込み位置のずれが 2 施設でみられた。施設に問い合わせたが、「そのような事実はない」という返事がかえってきた。しかしながら、一目で分かるように反応結果の記入場所が一つずつずれていることが分かっていたかと思う。自分のデータ入力についても責任を持っていただきたいと思う。DNA タイピングはある意味で究極的な方法であることから、誰もがそのデータを信用しているわけである。その意味でも血清学的検査法以上に慎重にならなくてはならないものと考えられる。

この方法を使用した施設においても表記ミスや判定ミスが複数の施設でみかけられた。

4. Micro SSP Generic HLA Class II DNA Typing Tray (Micro SSP 2L) (図 3)

サンプル H1601 から H1603 の 3 種類の DNA についてはまったく反応性に問題点は見られなかった。しかしながら、サンプル H1603 の HLA-DRB1*0701 アリルの判定において命名表から削除されている HLA-DRB1*0702 を判定していた施設が 2 カ所でみられた。昨年と同じようなことがあったが、検査を実施する者は、常に WHO の命名を把握できるような環境を整えておく必要がある。手元にアリル一覧や削除アリル一覧などを常に置いておくことが望まれる。

5. Micro SSP HLA Class I and Class II ABDR DNA Typing Tray (Micro SSP ABDR) (図 4)

サンプル H1601 から H1603 の 3 種類の DNA については反応性に問題点はほとんど見られなかったが、サンプル H1603 において一施設で偽陽性反応が原因で HLA-B*39 と判定されていた。また、前述のキットと同様に HLA-DRB1*0702 アリルの削除情報を知らないことによる判定ミスが 4 施設中 3 施設にみられた。DNA タイピングを実施する際には、手元にアリル一覧や削除アリル一覧などを置いて検査を実施することが望まれる。今後、改善されることを期待する。

6. ABC SSP Unitray (図 5)

サンプル H1601 から H1603 の 3 種類の DNA については問題となるような反応性がほとんど見られなかった。しかしながら、一施設でサンプル H1601 と H1603 において反応性に問題がないことから判定ミスと思われる結果が記載されていた。

サンプル H1604 については、HLA-B*1511, B*3501, B*5701 の 3 種類のアリルが存在することから、B*3501 と B*5701 の反応パターンの組み合わせが HLA-B*5301/02/04/05/08 の反応パターンを包含してしまう(図 6)。このことから、「コメント」欄などに「B*5301/02/04/+ の存在も否定できない」などの記載があるべきである。このようなコメントのあったのは、2 施設のみであった。もっと判定には慎重であるべきである。

7. DRDQ 2T Unitray (図 7)

サンプル H1601 から H1603 の 3 種類の DNA については問題となるような反応性がほとんど見られなかったものの、表記ミスが複数の施設にみかけられた。Micro SSP で問題となった HLA-DRB1*0702 の削除については、問題なく判定されていた。この問題点については、キットに添付されている判定表のみを頼りに検査を実施しているために起きている可能性が考えられる。やはり個々人のアップデートを日頃から念頭に置いていただきたいと思う。

H1601

Lot#	10			11			12			HLA-DRB1	HLA-DRB3.4.5	HLA-DQB1		
	F	D	I	G	C	B	A	E	D					
003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*0701	DRB3*0202/12	DRB4*0101/03/06	DQB1*0201/02	DQB1*0301/+
003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*1104	DRB3*01/02/03	DRB4*0101/02/03/+	DQB1*0201/02	DQB1*04/09/+
003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*07	DRB3*01	DRB4*01	DQB1*02	DQB1*0301
003	15	8	8	8	8	8	8	8	8	*0701/03/05/+	DRB3*01/02/03	DRB4*01	*0201/02/03	*0301/04/09
003	20	8	8	8	8	8	8	8	8	HLA-DRB1*11	nd	nd	HLA-DQB1*12	DQB1*04/09/+
003	43	8	8	8	8	8	8	8	8	HLA-DRB1*17	DRB3*0201/02/03/+	DRB4*0101/02/03/+	DQB1*0201/02	DQB1*04/09/+
003	52	8	8	8	8	8	8	8	8	*07	B3*01/02/03	B4*01	B1*02	B1*0301/04/09/+
003	64	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*0701/03/05/+	DRB3*01/02/03	DQB1*0201/02/03	DQB1*0301/04/09/+	DQB1*04/09/+
003	67	8	8	8	8	8	8	8	8	0701/03/05/+	B3*01/02/03	B4*0101/02/03/+	0201/02/03	0301/04/09/+
Recommended Assignment														
DRB1*1104										HLA-DRB1*11	HLA-DRB1*11	HLA-DRB4*01	HLA-DQB1*02	HLA-DQB1*03
DRB3*0202/12										HLA-DRB1*07	HLA-DRB1*07	HLA-DRB4*01	HLA-DQB1*02	HLA-DQB1*03
DRB4*0101/03/06										HLA-DRB1*0701/03/05/+	HLA-DRB1*1101/02/04/+	HLA-DRB3*01/02/03	HLA-DQB1*0201/02/03	HLA-DQB1*0301/04/09/+
DQB1*0201/02										unwritable	unwritable	unwritable	HLA-DQB2	unwritable
DQB1*0301/01										unwritable	unwritable	unwritable	HLA-DQB2	unwritable

H1602

Lot#	9			11			12			HLA-DRB1	HLA-DRB3.4.5	HLA-DQB1		
	C	B	I	C	G	F	A	E	D					
003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*1501	DRB5*01/01	DQB1*0501	DQB1*0602/11/20	
003	08	8	8	8	8	8	8	8	8	1501/02/03/+	DRB5*01/02	DQB1*0501	0601/02/03/+	
003	15	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*15	DRB5*01	DQB1*05	DQB1*06	
003	20	8	8	8	8	8	8	8	8	*1501/02/04/+	DRB5*01/02	*0501/02/03/+	*0601/02/03/+	
003	38	8	8	8	8	8	8	8	8	HLA-DRB1*15	nd	HLA-DQB1*15	HLA-DQB1*6	
003	43	8	8	8	8	8	8	8	8	*01	DRB5*01/02	*05	*06	
003	43	8	8	8	8	8	8	8	8	1501/02/04/+	DRB5*01/01/02/03/+	0601/02/03/+	0601/02/03/+	
003	62	8	8	8	8	8	8	8	8	*15	B5*01/02	B1*05	B1*06	
003	64	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*1501/02/04/+	DRB5*0101/02/03/+	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+	
003	67	8	8	8	8	8	8	8	8	0101/02/04/+	B5*01/02	0501/02/03/+	0601/02/03/+	
Recommended Assignment														
DRB1*1501										HLA-DRB1*15	HLA-DRB5*01/02	HLA-DQB1*05	HLA-DQB1*06	
DRB5*0101										DRB1*15	HLA-DRB5*01/02	HLA-DQB1*05	HLA-DQB1*06	
DQB1*0501										DRB1*1501/02/03/+	HLA-DRB5*0101/02/03/+	HLA-DQB1*0501/02/03/+	HLA-DQB1*0601/02/03/+	
DQB1*0602/11/20										unwritable	unwritable	HLA-DQB5	unwritable	

H1603

Lot#	9			11			12			HLA-DRB1	HLA-DRB3.4.5	HLA-DQB1		
	C	B	I	C	G	F	A	E	D					
003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*0101	DRB5*01/01	DQB1*0501	DQB1*0602/11/20	
003	08	8	8	8	8	8	8	8	8	0101/02/04/+	DRB5*01/02	DQB1*0501	0601/02/03/+	
003	15	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*01	DRB5*01	DQB1*05	DQB1*06	
003	20	8	8	8	8	8	8	8	8	*0101/02/04/+	DRB5*01/02	*0501/02/03/+	*0601/02/03/+	
003	38	8	8	8	8	8	8	8	8	HLA-DRB1*11	nd	HLA-DQB1*15	HLA-DQB1*9	
003	43	8	8	8	8	8	8	8	8	*01	DRB5*01/02	*05	*06	
003	43	8	8	8	8	8	8	8	8	0101/02/04/+	DRB5*0101/02/03/+	0601/02/03/+	0601/02/03/+	
003	64	8	8	8	8	8	8	8	8	*01	B1*05	B1*06	B1*06	
003	64	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*0101/02/04/+	DRB5*0101/02/03/+	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+	
003	67	8	8	8	8	8	8	8	8	0101/02/04/+	B5*01/02	0501/02/03/+	0601/02/03/+	
Recommended Assignment														
DRB1*0101										HLA-DRB1*01	HLA-DRB5*01/02	HLA-DQB1*05	HLA-DQB1*06	
DQB1*0501										DRB1*01	HLA-DRB5*01/02	HLA-DQB1*05	HLA-DQB1*06	
DRB1*0101/02/04/+										DRB1*0101/02/04/+	HLA-DRB5*0101/02/03/+	HLA-DQB1*0501/02/03/+	HLA-DQB1*0601/02/03/+	
DRB1*0101/02/04/+										unwritable	unwritable	HLA-DQB5	unwritable	

H1604

Lot#	9			11			12			HLA-DRB1	HLA-DRB3.4.5	HLA-DQB1		
	C	B	I	C	G	F	A	E	D					
003	8	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*1501	DRB5*01/01	DQB1*0501	DQB1*0602/11/20	
003	08	8	8	8	8	8	8	8	8	1501/02/03/+	DRB5*01/02	DQB1*0501	0601/02/03/+	
003	15	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*15	DRB5*01	DQB1*05	DQB1*06	
003	20	8	8	8	8	8	8	8	8	判定不可	DRB5*01/02	*0501/02/03/+	*0601/02/03/+	
003	43	8	8	8	8	8	8	8	8	HLA-DRB1*17	nd	HLA-DQB1*15	HLA-DQB1*6	
003	43	8	8	8	8	8	8	8	8	HLA-DRB1*11	DRB4*0101/02/03/+	DRB5*0101/02/03/+	0601/02/03/+	
003	52	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*0701/03/05/+	B4*01	B1*05	B1*06	
003	64	8	8	8	8	8	8	8	8	*07	B5*01/02	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+	
003	64	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*0101/02/04/+	DRB1*1501/02/03/+	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+	
003	67	8	8	8	8	8	8	8	8	01/07/15	B4*0101/02/03/+	B5*01/02	0501/02/03/+	
Recommended Assignment														
DRB1*0701										HLA-DRB1*07	HLA-DRB3.4.5	HLA-DQB1	HLA-DQB1	
DRB1*1501										DRB1*1501	DRB4*0101/03/06	DQB1*0303	DQB1*0303	
DRB3*0202/12										DRB1*15	DRB4*01	DQB1*05	DQB1*06	
DRB4*0101/03/06										判定不可	DRB4*01	*0501/02/03/+	*0601/02/03/+	
DQB1*0501										HLA-DRB1*17	nd	HLA-DQB1*15	HLA-DQB1*6	
DQB1*0303										DRB1*0701/03/05/+	B4*01	B1*05	B1*06	
DQB1*0602/11/20										DRB1*0101/02/04/+	DRB1*1501/02/03/+	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+	
DQB1*0602/11/20										DRB1*0101/02/04/+	DRB1*1501/02/03/+	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+	
Recommended Assignment														
DRB1*0701										HLA-DRB1*07	HLA-DRB3.4.5	HLA-DQB1	HLA-DQB1	
DRB1*1501										DRB1*15	DRB4*0101/03/06	DQB1*0303	DQB1*0303	
DRB3*0202/12										DRB1*1501/02/03/+	DRB4*01	DQB1*05	DQB1*06	
DRB4*0101/03/06										判定不可	DRB4*01	*0501/02/03/+	*0601/02/03/+	
DQB1*0501										HLA-DRB1*17	nd	HLA-DQB1*15	HLA-DQB1*6	
DQB1*0303										DRB1*0701/03/05/+	B4*01	B1*05	B1*06	
DQB1*0602/11/20										DRB1*0101/02/04/+	DRB1*1501/02/03/+	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+	
DQB1*0602/11/20										DRB1*0101/02/04/+	DRB1*1501/02/03/+	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+	
Recommended Assignment														
DRB1*0701										HLA-DRB1*07	HLA-DRB3.4.5	HLA-DQB1	HLA-DQB1	
DRB1*1501										DRB1*15	DRB4*0101/03/06	DQB1*0303	DQB1*0303	
DRB3*0202/12										DRB1*1501/02/03/+	DRB4*01	DQB1*05	DQB1*06	
DRB4*0101/03/06										判定不可	DRB4*01	*0501/02/03/+	*0601/02/03/+	
DQB1*0501										HLA-DRB1*17	nd	HLA-DQB1*15	HLA-DQB1*6	
DQB1*0303										DRB1*0701/03/05/+	B4*01	B1*05	B1*06	
DQB1*0602/11/20										DRB1*0101/02/04/+	DRB1*1501/02/03/+	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+	
DQB1*0602/11/20										DRB1*0101/02/04/+	DRB1*1501/02/03/+	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+	

図 2 Micro SSP Japanese HLA Class I and Class II ABCDRDQ DNA Typing Tray (Micro SSP JPN) Class II

H1601

Lot #	2	3	5	7	8	10	11	12	HLA-A	HLA-B	HLA-C
004	G	F	H	G	F	E	D	C	B	A	nd
005	8	8	8	8	1	8	1	8	1	B*1801	B*4403
005	4	8	4	2	6	1	8	1	A*25	B*44	C*16
005	8	8	8	8	1	8	1	8	1	*18	*12
005	8	8	8	8	1	8	1	8	1	A*3001/02/03+	Cw*1203/04/06+
005	6	8	8	8	0	8	1	8	0	B*1801/02/03+	Cw*1601/02
005	6	8	8	6	1	8	1	8	1	1203/04/06	1601/02
04A	12	8	8	8	8	1	8	1	8	1	1203/04/06
04A	31	4	4	1	6	6	4	1	1	1801/02/03+	1601
A*2501										*18	*12
A*3001										*44	*16
B*1801											
B*4403											

HLA-B HLA-C

Recommended Assignment

A*25 B*18 B*44

A*3001/02/03+ B*1801/02/03+ B*4402/03/07/+

unwritable unwritable unwritable

H1602

Lot #	1	2	6	8	10	11	HLA-A	HLA-B	HLA-C		
005	E	A	H	G	F	E	D	C	B	A	nd
005	8	8	8	8	8	8	A*0201	A*2402	B*3501	nd	
005	8	8	8	8	8	8	*02	*24	*35	*03	
04A	12	8	8	8	8	8	02/01/02/03+	2402/03/04+	3501/03/07/+	0303/11/13+	
04A	31	6	6	4	8	6	8	15 (75)	*35	*03 (9)	
A*0201											
A*2402											
B*1511											
B*3501											

HLA-B HLA-C

Recommended Assignment

A*02 B*15 B*35

A*0201/02/03+ A*2402/03/04+ B*3501/03/07/+

unwritable unwritable unwritable

H1603

Lot #	1	2	4	5	7	8	10	11	12	HLA-A	HLA-B	HLA-C
004	F	E	A	H	G	F	E	D	C	B	A	Cw*0702
005	1	8	8	8	8	8	8	8	1	8	8	nd
005	1	8	8	8	8	4	8	8	8	1	4	*01
005	6	1	6	8	8	8	0	0	0	8	8	Cw*0701/02/03/+
005	7	8	8	8	8	8	8	8	8	1	8	Cw*0102/03/07/+
04A	12	8	8	8	8	1	8	8	8	8	8	0102/03/07/+
04A	31	1	6	6	1	6	6	4	8	8	8	0701/05/06+
A*0201												*07
A*2402												
B*3801												
B*5101												

HLA-B HLA-C

Recommended Assignment

A*02 B*38 B*51

A*0201/02/03+ A*2402/03/04+ B*5101/03/07/+

unwritable unwritable unwritable

H1604

Lot #	1	2	6	7	8	10	11	12	HLA-A	HLA-B	HLA-C	
005	G	E	A	H	G	F	E	D	C	B	A	nd
005	4	8	8	8	8	8	8	8	8	1	8	B*5701
005	4	8	8	8	8	8	8	8	8	1	8	B*57
04A	12	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	Cw*0602/03/07/+
005	4	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0302/04/08+ 0602/03/07
04A	31	6	6	6	6	6	6	6	6	1	8	0602/03
A*0101												*06
A*0201												
A*2402												
B*1511												
B*3501												
B*5701												

HLA-B HLA-C

Recommended Assignment

A*01 B*15 B*35 B*57

A*0101/02/03+ A*2402/03/04+ B*1508/11/15 B*3501/03/07/+

unwritable unwritable unwritable

3 Micro SSP Generic HLA Class I DNA Typing Tray (Micro SSP 1L)

H1601

Lot #	Lab #	11				12				HLA-DRB1		HLA-DRB3,4,5	
		G	E	H	C	B				DRB1*0701	DRB1*1104	DRB3*0202/12	DRB4*0101/03/06
005	09	8	8	8	8	8	8	8	8	0701/02/03/+	1101/04/06/+	DRB3*0101/02/03/+	DRB4*0101/02/03/+
005	16	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*07	DRB1*11	DRB3*01/02/03	DRB4*01
005	21	8	8	8	8	8	8	8	8	0701/02/03/+	1101/04/06/+	DRB3*01/02/03	DRB4*01
04A	59	8	8	8	8	8	8	8	8	0701/02/03/+	1101/04/06/+	3*0101/02/03/+	4*0101/02/03/+
DRB1*0701										Recommended Assignment			
DRB1*1104										DRB1*07	DRB1*11	DRB3*01/02/03	DRB4*01
DRB3*0202/12										DRB1*0701/03/04/+	DRB1*1101/04/06/+	DRB3*0101/0201/+	DRB4*0101/02/03/+
DRB4*0101/03/06										unwritable	unwritable	unwritable	unwritable
DRB1*0702 allele does not exist (deleted allele)													

H1602

Lot #	Lab #	10			12			HLA-DRB1		HLA-DRB3,4,5		
		G	E	D				DRB1*0101	DRB1*1501	DRB5*0101		
005	09	8	8	8				0101/02/04/+	1501/02/03/+	DRB5*0101/02/03/+		
005	16	8	8	8				DRB1*01	DRB1*15	DRB5*01/02	-	
005	21	8	8	8				0101/02/04/+	1501/02/03/+	DRB5*01/02		
04A	59	8	8	8				0102/04/05/+	1501/02/03/+	5*0101/02/03/+	-	
DRB1*0101								Recommended Assignment				
DRB1*1501								DRB1*01	DRB1*15	DRB5*01/02		
DRB5*0101								DRB1*0101/02/04/+	DRB1*1501/02/03/+	DRB5*0101/0202/+		
								unwritable	unwritable	unwritable		

H1603

Lot #	Lab #	10	HLA-DRB1		HLA-DRB3,4,5	
		G	DRB1*0101			
005	09	8	0101/02/04/+	-	-	
005	16	8	DRB1*01	-	-	
005	21	8	0101/02/04/+	-	-	
04A	59	8	0102/04/05/+	-	-	
DRB1*0101			Recommended Assignment			
			DRB1*01			
			DRB1*0101/02/04/+			
			unwritable			

H1604

Lot #	Lab #	10				11				12				HLA-DRB1		HLA-DRB3,4,5	
		G	E	H	D	B				DRB1*0101	DRB1*0701	DRB1*1501	DRB4*0101/03/06	DRB5*0101			
005	09	8	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*0101/02/04/+	DRB1*0701/02/03/+	DRB1*1501/02/03/+	判定不能				
005	16	8	8	1	8	8	8	8	8	DRB1*01	DRB1*07	DRB1*15	DRB4*01	DRB5*01/02			
005	21	8	8	1	8	8	8	8	8	0101/02/04/+	0701/02/03/+	1501/02/03/+	DRB4*01	DRB5*01/02			
04A	59	8	8	1	8	8	8	8	8	DRB1*0102/04/05/+	DRB1*0401/02/03/+	DRB1*1501/02/03/+	DRB4*0101/02/03/+	DRB5*0101/02/03/+			
DRB1*0101										Recommended Assignment							
DRB1*0701										DRB1*01	DRB1*07	DRB1*15	DRB4*01	DRB5*01/02			
DRB1*1501										DRB1*0101/02/04/+	DRB1*0701/03/04/+	DRB1*1501/02/03/+	DRB4*0101/02/03/+	DRB5*0101/0202/+			
DRB4*0101/03/06										unwritable	unwritable	unwritable	unwritable	unwritable			
DRB5*0101										DRB1*0702 allele does not exist (deleted allele)							

図 6 Micro SSP HLA Class I and Class II ABDR DNA Typing Tray (Micro SSP ABDR) Class II

	1	2	7	25	26	30	35	42	43	61	64	68	76	78	81	90	92
	1	4			5			6	8		9	10	11		12		
	A	B	G	A	B	F	C	B	C	E	H	D	D	F	A	B	D
B*1511																	
B*3501																	
B*5701																	
B*5301/02/04/05/08																	

図 8 ABC SSP Unitray における HLA-B*15, B*35, B*57 と B*53 の反応パターン

8. まとめ

全体的には、昨年度の QC ワークショップに比して、反応性が向上し、偽陽性反応や偽陰性反応の減少がみられた。また、表記法や判定についても向上

していたが、まだ多くの施設でミスがみられることから、表記法の原則や削除アレルなどを熟知し、なお一層の努力が望まれる。

第 8 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)—

柏瀬貢一¹⁾, 太田正穂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) 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) 日本薬科大学生物学, 4) 国立病院機構千葉東病院 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

今回のワークショップのサンプルの特徴と狙いは、以下の 3 点が挙げられる。

- ① 正確なタイピング
→ 外国人由来の稀なアレルやハプロタイプが崩れたサンプルによりそれぞれ使用している方法の正確性の確認
- ② 奇妙なデータが得られるタイピング
→ キメラサンプルによる 3 量体, 4 量体の検出およびハプロイドの量的な差異の検出
- ③ 少量 DNA からのタイピング
→ ろ紙にスポットした少量の DNA によるタイピング精度の確認

今回のワークショップのサンプルが RFLP, SBT, SSCP, RSCA 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コメントを基に解析を行った。

2. 原理

RFLP (restriction fragment length polymorphism)

制限酵素により変異部位が切断し得るかを電気泳動により確認を行う方法。

長所として、高価な機器が必要なく比較的簡単に操作が行える。

短所として、すべての変異部位に対する制限酵素があるとは限らない。また、制限酵素の失活による部分切断など判定に注意を要する。

SBT (sequence-based typing)

PCR 産物をシーケンサーにより泳動を行い、直接塩基配列を解析する方法。

長所として、解像度が高いことが挙げられる。

短所として、RFLP と同様に *sis/trans* を区別することはできない。

SSCP (single-strand conformation polymorphism)

PCR 産物を熱変性などで一本鎖にし、電気泳動に

より一本鎖 DNA の移動度の差異を検出する方法。

長所として、未知の変異を検出できる点や *sis/trans* を区別できる。

短所として、アリルを同定するためには、他の方法で確定された標準 DNA が必要である。

RSCA (reference strand-mediated conformation analysis)

標準 DNA とサンプルとのヘテロデュプレックスの移動度によりタイピングを行う方法。

長所として、SSCP 同様 *sis/trans* を区別できることや新規アリルの検出が可能であることと、量的差異を検出可能であることが挙げられる。

短所は、未だすべての対立遺伝子を区別できるまで至っていないことや、蛍光物質を検出できるゲルタイプの電気泳動装置が必要である。

3. 参加施設・方法

今回、データが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 タイピングに用いられていた。HLA-B は 1 施設だけ用いられていたが RFLP 法を使用していたのは H1606

の 1 サンプルだけであった。SBT 法は主に HLA-A, B, C, 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 法を HLA-DRB1, DQB1, DPB1 に用いていた施設は昨年度がそれぞれ 5, 3, 2 施設だったが、今年度はそれぞれ 2, 2, 1 施設と減少した。1 施設のみが HLA-A, B, DRB1 を RSCA 法によりタイピングが行われていた。

4. 反応・判定結果および問題点

RFLP 法

一部の施設において、H1606 (ろ紙) のタイピングが困難とコメントされていた。十分量の PCR 産物が得られないと RFLP の判定は困難であると考えられた。また、制限酵素の種類によりアリルの絞込みができないとコメントされていた (DRB1*07 など)。

SSCP 法

SSCP 法を DRB1 のタイピングに用いた 2 施設とも、H1601 と H1606 のアリルの同定ができないとコメントされていた。原因として、DRB1*1104 の標準 DNA の入手が困難で同定できなかったことにあるが、稀なアリルについて標準 DNA を用意する

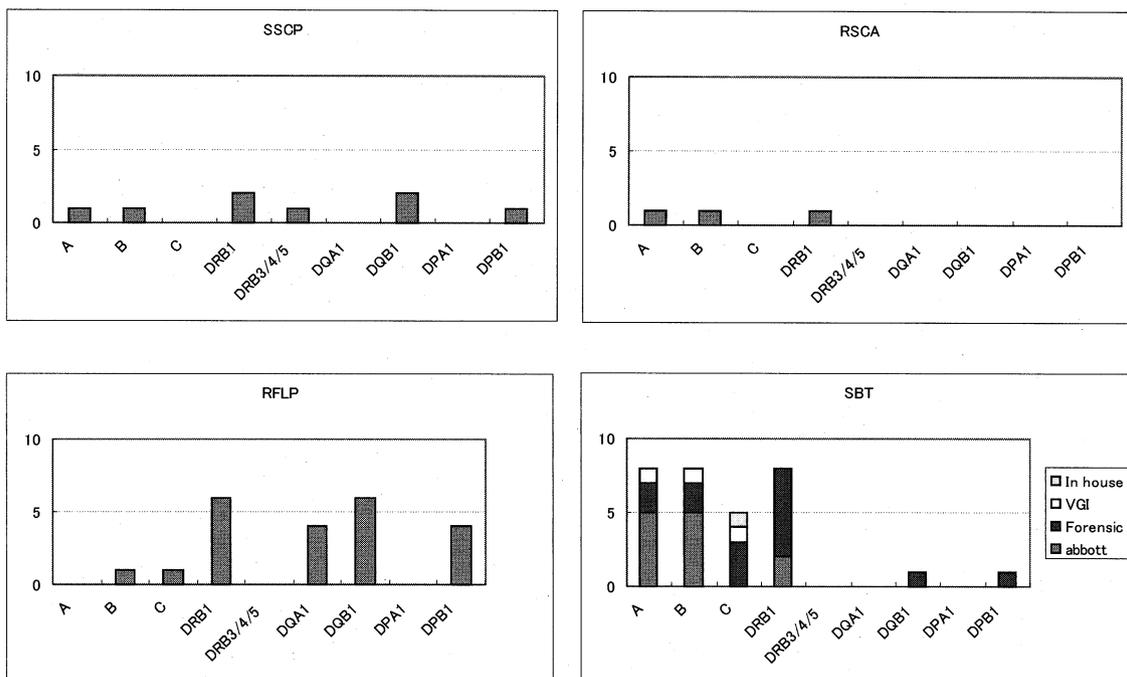


図 1 方法論別の使用施設数

ことは極めて困難であり、SSCP法の限界がこのような点にあることは昨年のQCWSでも報告した。昨年のQCWSでは5施設がDRB1のタイピングにSSCP法を使用していたが、今年度は2施設となったことからその点がうかがえる。

SBT法

予想通り稀なアリのルの同定が行われていた。H1605とH1606のろ紙由来DNAサンプルのBローカスにおいてPCR増幅不能によりタイピング結果が得られなかったとコメントされた(施設コード11)。Abbott社のPCRは約2kbと比較的長めのPCR増幅を行うため、DNAの量がある程度多めに必要になることから増幅が困難であったと思われる。なお、H1601のDPB1においてDPB1*0301,0601とDPB1*200101,2901がambiguityとコメントが記載されていた。使用された判定ソフトが最新のアリのルをフォローしており正確性の高いambiguityの判定結果を得ることができたと推測される。

RSCA法

この方法の特徴は、増幅量を数値化し易いことが

挙げられる。今回、キメラを模したサンプルではアリのル間の増幅量が数値化されたデータが提出された。この様にキメラ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、H1601のコンセンサス(正解)のDRB1*1104がDRB1*1101と区別できなかったことから、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おらず、更なる改良が望まれる。また、H1603のBローカスにおいてB*3801とB*5101以外に第3のアリのルとしてB*1567あるいは新アリのルを示唆するようなデータが得られたとコメントされた。

5. まとめ

今回のQCWSの目的である稀なアリのルへの対応を考慮した場合、RFLP, SBT, SSCP, RSCA法の4つの内、標準DNAを必要としないSBT法が最適と思われた。また、キメラへの対応としては、4つの方法ともアリのルを同定することは困難であった。確実にキメラの存在自体を確定するためにはHLAタイピング以外(マイクロサテライト等)で確認することも必要と思われた。

第8回 HLA-QC ワークショップレポート —テーマ別検討(濾紙サンプルについて)—

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) 日本薬科大学生物学, 4) 国立病院機構千葉東病院 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

第7回 HLA-QC ワークショップに続き、本年度も同じテーマで濾紙に添付したサンプルからの

HLA-DNA タイピングを行った。昨年と異なり、濾紙に添付したサンプルは DNA ではなく、培養細胞である。検査は約 100,000 個の細胞がスポットされ

た2種類のサンプル H1605 と H1606 について行った。濾紙からの DNA 抽出は、各検査施設で実施したタイピング法の感度と精度について考察するため、QCWS 部会が推奨する統一したプロトコールに基づいて行って頂いた。今回、サンプルの一は2種類の細胞を9:1の割合で混合し濾紙に添付したものを使用しており、血液で見られるキメラ状態をこのようなサンプルでも判定可能であるか、その結果と各施設からの報告に興味を示された。

2. 検査試料・DNA抽出法

参加施設には、濾紙に細胞を添付した2種類のサンプル (H1605 と H1606) を配付した。H1605 は THP-1 細胞 (A*0201A*2402, B*1511B*3501, DRB1*0101DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0101/04/05DQA1*01012/03, DQB1*0501DQB1*0602/11/20, DPA1*0103DPA1*0202, DPB1*0201DPB1*0402) と HL-60 細胞 (A*0101, B*5701, DRB1*0701, DRB4*0101/03/06, DQA1*0201, DQB1*0303, DPA1*0103, DPA1*0201, DPB1*0201DPB1*1301) が1:9の割合で総数およそ100,000個分スポットされたものである。また、H1606 は A549 細胞 (A*2501A*3001, B*1801/17, NB*4403, DRB1*0701, DRB1*1104, DRB3*0202/12, DRB4*0101/03/06, DQA1*0201, DQA1*0501/03/05, DQB1*0201/02, DQB1*0301/+, DPA1*0103, DPB1*0301, DPB1*0601) が約100,000個分スポットされている。

DNA 抽出は QCWS 担当部会で推奨した標準プロトコール(表1)に従って行うことを依頼し、DNA タイピングは参加施設で通常行われている方法で検査しその結果を提出して頂いた。

3. 結果と考察

1) 判定に参加した施設数と判定一致率

a) サンプル H1605

サンプル H1605 は人為的に二つの細胞を1:9の割合で混合し作製した複雑な試料であり、判定結果の一致率がその施設の判定精度を必ずしも反映しているとは言えない。今回のように HLA 型がキメラ様を示す結果で、しかも血液細胞を直接観察せず濾紙から抽出した DNA のタイピングだけで判定結果を提出しなければならないときに、判定不能という報告をした施設の報告書については検討する必要があると思われる。ここでの判定結果の一致率は、あくまで2種類の細胞を混合してタイプされるコンセンサス遺伝子型との一致率を示した。

サンプル H1605 タイピングで HLA 型を報告した施設は総数54でありその内訳を表2に示した。この報告で判定不能としたが、考え得る可能な型を示した施設はタイピン実施施設に含まれ、型の報告を記していない施設は除外した。最も多くの施設が報告したローカスは A と DRB1 であり、44 施設 (81%) が実施していた。続いて多かったのは B 座 (42 施設) であった。最も少ないのは DQA1 と DPB1 ローカスであった (3 施設)。判定結果報告が多かった遺伝子座は、臨床的に必要とされている遺伝子座、あるいはタイピングキットに含まれる判定用の遺伝子座構成に依存していると考えられた。しかし、骨髄移植など臨床的に重要と言われている C 座の報告施設 (21 施設, 39%) がそれほど多くなかったのは、まだこの遺伝子座の検査がルーチン検査で必需性が少ないかと感じた。

本サンプルを行った方法の解像度は、大多数の施

表1 濾紙からの DNA 抽出法(同一プロトコール)

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1000 μ l 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. 100 μ l 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 $^{\circ}$ C ~ 95 $^{\circ}$ C 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。

設で low and medium resolution level であり, high resolution level で判定結果を提出したのは, 大多数が DPB1, DRB3/4/5, DRB1 でありいずれも 30% 以下であった(表2)。また, タイピングの一致率(コンセンサス遺伝子型と一致)は, DQA1 座を除いて low/medium でも high でもそれほど高くはなく, 50% を超える一致率を示したのは, DRB3/4/5 座 (low/medium: 52%) と C 座 (low/medium: 56%, high: 67%) であり, 残りのほとんどは 20~30% 台であった。このようにこのサンプルにおけるタイピングの一致率が低いのは, サンプルの組成が複雑(2種類の細胞を 1:9 の割合で混合)であることと, DNA 抽出が血液からではなく濾紙からであったことが原因であると考えられる。

b) サンプル H1606

サンプル H1606 のタイピング参加施設数とその判定結果を表3に示した。このサンプルは単一細胞(A549)を濾紙に添付したものであることから, コンセンサス遺伝子型と各施設からの判定結果は, いずれも高い一致率(90%以上)を示した。この結果は昨

年(7thQCWS)と同様に好成績を示しており, DNA 抽出法と各施設で用いたタイピングテクニックの質の高さに由来すると考えられた。多くの施設で本サンプルのタイピングに low/medium level のタイピングを試みている。また, タイピング結果を提出した施設はサンプル H1605 と同様 DRB1(97%), A(90%), B(88%) 座が多かった。

2) タイピング結果詳細と施設数

各施設からの H1605 サンプルのタイピング結果は多様であったので, サンプルのコンセンサス遺伝子型と報告された型について詳細な検討を行った(表4)。サンプルの組成(2種類のサンプルの混合比)から, 一方の細胞(HL60)の HLA 型が優位にタイピングされると考えられるが, コンセンサス遺伝子型と一致するタイプを提示できなかった施設からの結果は, 原則と異なっているものが見られた。Low/Medium レベルにおいて A, C, DRB4/5 座では HL60 サンプルの型のみを報告する施設が多かったが, その他の B, DRB1, DQB1 座では HL60 のタイプとへ

表2 参加施設数と一致率(H1605)

遺伝子座	結果提出施設数 N=54 (%)		コンセンサス 遺伝子型	Low/Medium		High	
	使用数 (%)	一致率 (%)		使用数 (%)	一致率 (%)		
HLA-A	44	81	*0101,*0201,*2402	40/44 (91)	8/40 (20)	4/44 (9)	1/4 (25)
HLA-B	42	78	*5701,*1511,*3501	33/42 (79)	8/33 (24)	9/42 (21)	2/9 (22)
HLA-C	21	39	*0602,*0303	18/21 (86)	10/18(56)	3/21 (14)	2/3(67)
HLA-DRB1	44	81	*0701,*0101,*1501	34/44 (77)	11/34 (32)	10/44 (23)	2/10 (20)
HLA-DRB3/4/5	23	43	B4*0101/03/06,B5*0101	23/23 (100)	12/23 (52)	0	
HLA-DQA1	3	6	*0201,*0101/04/05,*0101/02/03	3/3	3/3(100)		
HLA-DQB1	18	33	*0303,*0501,*0602	13/18 (72)	2/13 (15)	5/18 (28)	2/5 (40)
HLA-DPB1	3	6	*0201,*1301,*0402	1/3(33)	0/1(0)	2/3 (67)	0/2 (0)

推定される反応の強さ

HLA-A:*01>*02=*24, HLA-B*57>*15=*35, HLA-Cw*0602>*0303, HLA-DRB1*07>*01,*15

表3 参加施設数と一致率(H1606)

遺伝子座	結果提出施設数 N=58 (%)		コンセンサス 遺伝子型	Low/Medium		High	
	使用数 (%)	一致率 (%)		使用数 (%)	一致率 (%)		
HLA-A	52	90	*2501,*3001	23/52 (44)	21/23 (91)	29/52 (56)	29/29 (100)
HLA-B	51	88	*1801/17 N,*4403	43/51 (84)	40/43 (93)	8/51 (16)	7/8 (88)
HLA-Cw	23	40	*1203,*1601	19/23 (83)	4/19 (100)	4/23 (17)	4/4 (100)
HLA-DRB1	56	97	*0701,*1104	44/56 (79)	41/44 (93)	12/56 (21)	9/12 (75)
HLA-DRB3/4/5	25	43	3*0202/12.4*0101/03/06	24/25 (96)	23/24 (96)	1/24 (4)	0/1 (0)
HLA-DQA1	4	7	*0201,*0501/03/05	3/4 (75)	3/3(100)	1/4 (25)	1/1 (100)
HLA-DQB1	21	36	*0201/02,*0301/+	16/21 (76)	16/16 (100)	5/21 (24)	5/5 (100)
HLA-DPB1	3	5	*0301,*0601	1/3 (33)	1/1 (100)	2/3 (67)	0/2 (0)

表 4 H1605 で提出されたタイプと施設数

	Low/Medium				High			
A	*01 16	*01,*02 8	*01,*24 4	*01,*02,*24 8	*0101,*0202 1	*0101,*0202,*2402 1		
B	*57 6	*57,*15 13	*57,*35 1	*57,*15,*35 8	*5701 2	*5701,*1511 2	*5701,*1511,*3501 2	
C	*06 7	*06,*03 10			*0602 1	*0602,*0303 2		
DRB1	*07 2	*07,*01 6	*07,*15 3	*07,*01,*15 11	*0701 2	*0701,*0101 3	*0701,*1501 3	*0701,*0101,*1501 2
DRB4,DRB5	B4*01 9	B5*01 2	B4*01,B5*01 12					
DQB1	*03 1	*03,*05 6	*03,*06 1	*05,*06 2	*03,*05,*06 2	*0303,*0602 1	*0303,*0501,*0602 2	

表 5 コンセンサス遺伝子型と異なった判定例 (H1605)

HLA-A			
1	*0101	*0201	*2402
2	0101/04/09	0201/07/09/+	2408
3	0101/04N/09		2410/22/31/+
4	0102	0249	
5	0101		3601

HLA-DRB1			
	*0701	*0101	*1501
1	0701/03/04/+		1601/03/05/+
2	0701/03/04/+	0106/09	
3	0701/03/04/+	0106/09	1501/02/04/+
4	0701/03/04/+	0106	1501/02/04/+
5	0701/03/+		1405/02/1408/+
6		0101/05/07/+	0602

2 labo
5 labo

HLA-B			
1	*5701	*1511	*3501
2	5301	1511	
3	5701	1511	5801
4	5701/06	1531	
5	5701/02/03/+	1508	3501/07/11/+
6	5701/06		3532
7	5301/02/03/+	1516/67	

HLA-DQB1			
	*0303	*0501	*0602
1	0303/12	05031	
2	0306	0501	
3	0201		

HLA-C			
1	*0602	*0303	
2	0602	0304/09	

テロ接合体である THP-1 の一方の型とが組み合わさったヘテロ型で報告する施設が大多数であった。このような結果は、判定キットに含まれるプライマーの設定、PCR 条件などが原因であるか、あるいは検査者が先入観として、通常は 1 座当りのアレルはヘテロ接合体の 2 種類と考え、弱い反応を擬陽性として排除した可能性も考えられるが、詳細な検討が必要である。

3) タイピング誤判例

H1605, H1606 サンプルで、明らかにコンセンサス遺伝子型に含まれていないアレルを報告した例を表 5, 6 に示した。表中色塗りし、ボールドで記した

タイプがコンセンサスにない異なったタイプである。誤判例で特徴的なのは high resolution で報告した結果で多く見られた。High resolution による報告は、精度の高い価値ある情報を提供するが、検査結果には注意が必要である。特に今回のように血液以外からの DNA 抽出、さらに微量な試料から抽出した DNA を用いたときは、2 種類以上の検査法を用いて確認することが重要である。

4) タイピングを行った遺伝子座

今回それぞれのサンプルについてタイピングを行った遺伝子座数は、H1605 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

表6 コンセンサス遺伝子型と異なった判定例 (H1606)

HLA-A		
	*2501	*3001
1	2402/20	
2	2501/02	3011

HLA-B		
	*1801/17 N	*4403
1	35	44
2	1503	
3	1501/03/05/+	4403/07/26/+
4	1546/53	1809

HLA-C		
	*1203	*1601
1	1203/06/07/+	- #
2	12	- \$
3	12	06

HLA-DRB1		
	*0701	*1104
1	07	-
2	0701	1101
3	0701	1101
4	0701	1101
5	0701/02/03/+	1110/12
6	0701/03/+	1405/02/1408/+

HLA-DRB3, DRB4		
	3*0202/12	4*0101/03/06
1	0202	
2	0208	0101/02/03+

HLA-DPB1		
	*0301	*0601
1	0303	0601
2	0306	0601

#:4施設,

\$:3施設 (MicroSSPJpn, MPH)

表7 判定結果に記載されたコメント例

- H1606においては、DPB1、DQB1につきましては反応不明瞭の為判定不能とさせていただきます。
- H1605はB locusではB*1508/11/15、B*3501/03/07/+とB*5701/06がタイプされ、DR locusではDRB1*0101/02/04/+、DRB1*0701/02/03/+とDRB1*1501/02/03/+がタイプされた。これもタイプが3つ取れたため全てのlocusを判定不能とした。
- 昨年、ろ紙の検体はSSOでやりましたが、今年はSSPでやってみようと思いついて工夫してみましたがダメでした。
- HLA Typing検査は1種類 (SSP) の検査法のみで検査を実施しているため、他の検査法での (コンタミネーションなどを含め) 確認をすることはできませんでした。
- 1605の結果は専用の判定ソフトでは判定不能でした。意図的に混合されたサンプルと思われる。
- アレルが同定出来たがクラスIIがトリプレットになった為総合判定はしなかった。
- サンプルH1605,1606の判定で一部3つのHLAタイプが検出されました。
- H1605:三量体となり判定不能
- H1605のDRB1のアレルタイピングで、RFLP法でDRB1*0101、DRB1*07、DRB1*1501/03の複数のタイプが判定されたが、SBT法ではDRB1*0101、DRB1*1501の2つのアレルのみが確認できた。しかし、総合的に見ると複数のアレルが確認されたため判定不能と記載した。複数の候補がでてしまった検体が多くあり、その場合、総合判定を報告するときは、全てのアレルに対して判定不能と報告するか悩んだ。つまり、他のローカスで決定されたアレルのなかに見落としているものが含まれている可能性を否定できないためである。
- H1605、H1606はタイピング不能
- H1604, H1605はコンタミネーション?
- H1605は複数のタイプが考えられ、判定不能としました。

(9施設: 17%), 次に A, B, DRB1 の3座が8施設 (15%), A, B, C, DRB1 の4座が6施設 (11%) であった。7座のタイピングを実施している施設が4施設 (8%) 見られ、微量資料からでも多くの遺伝子座のタイピングが可能であることが示唆された。

サンプル H1606 では、圧倒的に A, B, DRB1, DRB3/4/5 の4座 (22%) と A, B, DRB1 の3座 (21%) の報告が多かった。このサンプルでも7座を

報告している施設は4施設 (7%) あり、タイピング法の感度が向上していることが伺われる。両サンプルの報告遺伝子座数が似た傾向を示しているのは、タイピングに用いた判定キットに依存していると考えられる。

今回の QCWS の解析報告書から多くの事を考えさせられた。また H1605 サンプルで見られたように、ある遺伝子座では3つのアレルがタイプされ、

しかも用いたタイピング法によっては判定結果に強弱も観察されるルーチン検査では通常見られない現象について、各施設がどのように対処したか興味を持たれた。今回は明らかに判定不能と示した施設とタイピング結果にコメント(表7)を添付して報告した施設があり、解析に参考となった。このように通

常ではみられない3つのアレルが検出されたときは、その遺伝子座近傍、あるいは遺伝子座内に存在するマイクロサテライトを用いた補助検査を試みることも重要であると思われる。さらに、判定結果には異状現象が認められたことを説明するようなコメントが必要であろう。

第8回 HLA-QC ワークショップレポート —テーマ別検討: 模擬キメラ—

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) 日本薬科大学生物学, 6) 国立病院機構千葉東病院 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

模擬キメラサンプルについて (H1604, H1605)

「キメラ」とは、複数の個体(あるいは配偶子)に由来する細胞が単一の個体に共存する状態と定義される。実際には、造血幹細胞の移植後の末梢血に見られるだけでなく、医療行為に伴わない場合でも、妊娠時に胎児由来の細胞が少数ながらも母体末梢血に現れたり、稀には双胎(多胎)の胎児間で造血幹細胞が移行して生ずることが知られている。HLA の型の異なる細胞が同一個体内に存在することによって、惹き起こされる生物学的効果については、議論のあるところであるが、今回のワークショップでは HLA 型決定の場での問題点として、キメラの状態を模した検体 H1604, H1605 を用いて、HLA 型決定の方法論ごとにその検査結果がどのように影響されるかを検討し、キメラであることを実証する方法、さらにその混在比を知る方法について考察した。

検体 H1604, H1605 は、キメラを模倣するものとして、2種類の細胞株 THP-1 (H1602 と同一)と HL60 の DNA を混和 (H1604)、あるいは細胞懸濁

液を混和 (H1605) して作製された(図 4.1.1)。以下、方法論毎の結果を記す。

(1) SSP および SSO

SSP では混在比が低い場合でも概ね2種類を超えるアレルを検出する傾向にあり、SSO では個々のプローブの感度によるが混在比が低いアレルは弱いシグナルを示すため、検出不可能かあるいは判定不能となる傾向にある。詳細は方法論別検討 SSP の項、SSO の項を参照。

(2) SBT

塩基配列決定の前段階の増幅反応に座位特異的なプライマーを用いている場合はキメラの混在比に対応した信号強度が得られるが、プライマーがアレルグループ毎に設定されている場合は、プライマーを競合しないアレルの信号がキメラの混在比に相応な強度よりも強調される可能性がある。いずれの場合も SSO と同様に、混在比が低いアレルは弱い信号

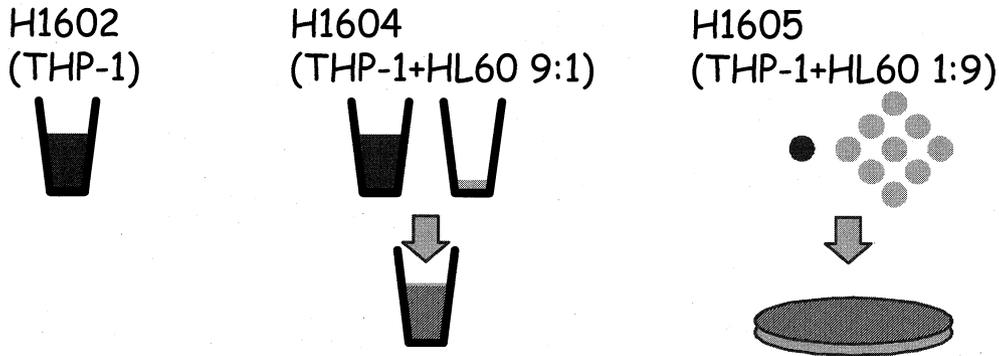


図 4.1.1 検体 H1604, H1605 の調製

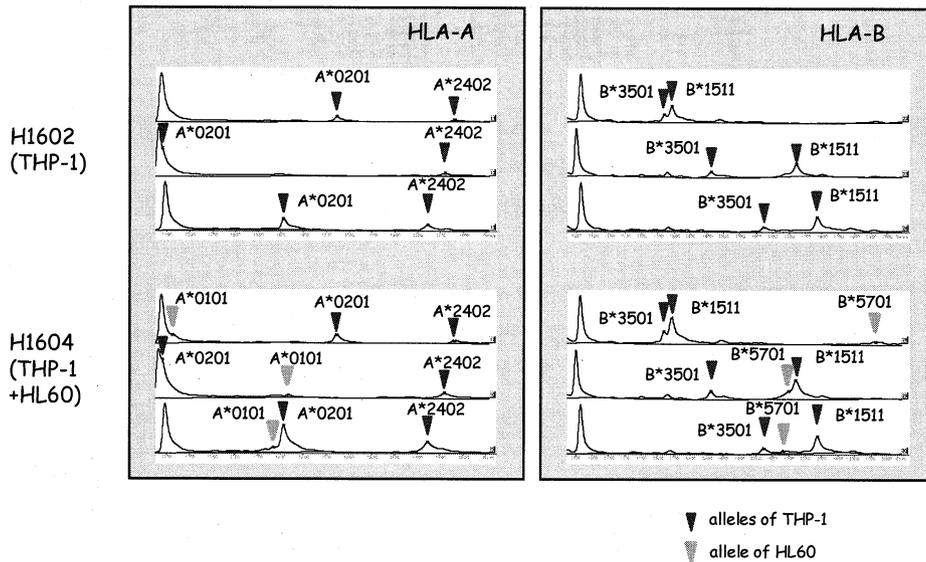


図 4.1.2 RSCA 法による解析

を示すため、検出不可能かあるいは判定不能となる傾向にある。また、混在比が高い際にも判定ソフトを用いると、2 アリル以上のアサインメントには対応していないため、判定はできないという結果になる。

(3) RSCA

RSCA では 2 種類を超えるアリルが存在してもそれぞれを型判定することが可能なだけでなく、信号強度から各々のアリルがどのくらい含まれているかを推定できる。実際、H1504 において第三のアリルが検出され、型判定も可能であり、キメラの混在比を推定することができた(図 4.1.2)。また、前回(第 7 回)のワークショップで、対立遺伝子間での量比が

1:1 から偏移する、いわゆる「ヘテロ接合性の消失 (Loss of heterozygosity, LOH)」を模した検体の解析においても有用であることが明らかであったが、今回も H1602 (THP-1) がおそらく LOH のため、2 アリルの信号強度が約 2 対 1 となっていることが判明した。

(4) マイクロサテライト多型

マイクロサテライト多型解析は、遺伝性疾患の原因遺伝子探索や、様々な個人差の遺伝学的研究に用いられるだけでなく、法医学の分野でも個人識別や親子鑑定において重要な位置を占める手段である。このマイクロサテライト多型解析によってキメラであること、さらに細胞の混在比を推定することが可

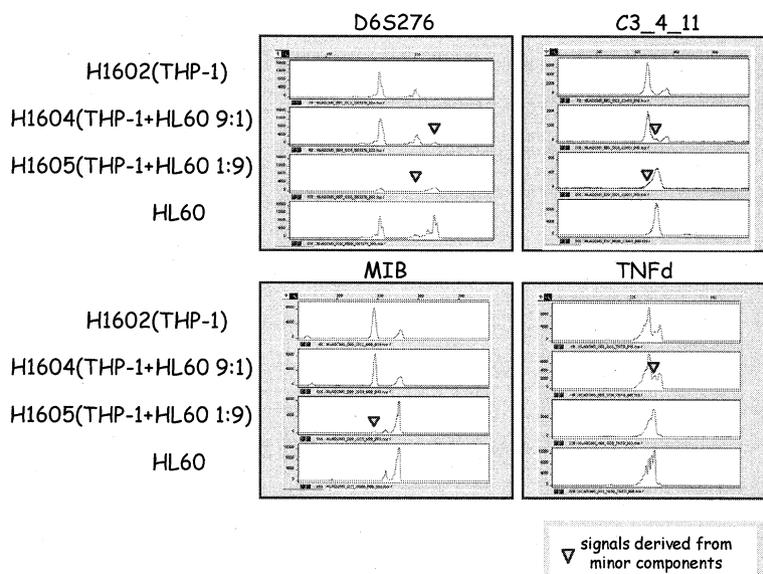


図 4.1.3 マイクロサテライト多型解析

能である。多型は HLA 領域に限らず、すべての染色体上に散在しているが、ここでは HLA 領域の 4 つのマイクロサテライト多型マーカーを用いて解析

した例を示す(図 4.1.3)。RSCA でも同様であるが、混在比が 5% 以下である場合、信号がノイズに隠れて検出できないことが多く、注意が必要である。

第 8 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 HLA 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) 日本薬科大学生物学, 4) 国立病院機構千葉東病院 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

日本組織適合性学会では、昨年「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グイティ (ambiguity) の取扱いの原則 (2003 年度版)」(以下、表記法)が本学会の HLA 標準化委員会から

提示され、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行なうことになっている。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結果の結果表記を、ローカスごとに集計し、表記法とは異なる結果については表中に網掛けで示した(表1~6)。また、結果集計を行うために、一部の結果表記を以下に示す内容で変更を行なった。

- ローカス名を削除した。
- ブランクを意味するハイフン(“-”または“-”)を削除した。(表記法では、片方のアレルだけが検出された場合に、“-”(ハイフン)を入力することとされているが、一部のデータでは、両方のカラムに“-”(ハイフン)が入力されている場合と、未記入(空欄)であった場合があり、“-”(ハイフン)が入力されたカラムを空欄に変更し、未記入として集計した。)
- アレルの表記である“*” (アスタリスク)を削除し、集計した。
- 判定不能、判定不可、判定保留または“?”を、N.D.とした。

2.1. アレル表記の問題点

① HLA型(抗原型)での表記

DNAタイピング結果のアレル表記として、HLA型に置き換えて報告された例(例: A*1, DRB*1, DRB1*7, DQB1*5)が見られた。2桁レベルのタイピングキットでの結果を、そのまま入力または“0”(ゼロ)を入力し忘れたものと思われるが、表記法としては、「アンビギュイティ(ambiguity)の取扱い」に従い、表記することが必要である。

② 区分出来ないアレルの表記

例として、DRB1*07, DRB1*11など2桁による結果の表記が見られたが、2桁レベル(粗分別, low resolution)のタイピングを行なった結果を表記したものだと思われるが、出来ればこのような表記においても、表記法の「アンビギュイティ(ambiguity)の取扱い」に従い、“/”(スラッシュ)を用いた区分出来ないアレルを表記する表記法が必要である。

③ “/”(スラッシュ)を用いたアレルの表記

“/”(スラッシュ)を用いた区分不可能なアレルの表

記として間違っていた例を以下に示す。

- 3種類のアレルを記し、最後に“/+”とするところを、4種類のアレルを表記した例(DRB1*0101/04/05/07/+)
- 区分不可能なアレルを2桁で表記するところを、3桁で表記した例(DRB1*0101/021/04/+)
- “/+”(スラッシュ, プラス)は、4種類以上の区分不可能なアレルがある場合に用いるが、2種類のアレル表記に“/+”を用いていた例(DRB1*0701/03/+), 2種類だけの表記なら“+”は不要となる。
- 3種類のアレルを記し、最後に“/”(スラッシュ)が抜けている例(DRB1*0101/02/04N+)
- 最初のアレルを4桁表記するところを、5桁で表記した例(DRB1*07011/03/04/+)

④ 5桁目以降の区分出来ないアレルの表記

表記法では、「5桁以上の細分化が知られているアレルで、5桁以上でアレルが特定できた場合にのみ、その桁数でアレルを記載する」とされており、5桁目以降の区分出来ないアレルがある場合は、4桁で表記するとなっている。そのため、DRB1*070101/02の表記は間違いで、DRB1*0701と表記する必要がある。

また、現在WHOの命名委員会では5桁目以降2桁で同義置換のアレルを表記するようになっているが、未だに5桁目の1桁で同義置換のアレルを表記してある例が見られた。

⑤ N(null)の表記

表記法の「アンビギュイティ(ambiguity)の取扱い」では、区分出来ないアレルを、最初4桁、以降2桁で表記することになっていることから、nullを意味する“N”については表記する必要はない。(例: A*0101/02/04N/+およびB*3501/07/40N/+等の結果表記では、“N”を表記しない。)

⑥ 判定不能、判定不可、判定保留の表記への対応

今回のQCWSではキメラのサンプルが配布され、検出された3種類のアレルを記載した施設と、判定不能、判定不可等の表記をした施設がそれぞれあった。

表1 HLA-A ローカス表記の集計

Sample :H1601				
Allele:A*250101		Allele:A*3001		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	1	1 未記入 (または-)	1	
2 25	13	2 30	14	
3 25/43/66	1	3 3001	37	
4 2501	37	4 3001/02/03/+	8	
5 2501/02	6	5 3001/08	7	
6 2501/02/03/+	6	6 3001/11	1	
7 2501/03/04	1			
8 2501/03/04/+	1			
9 2501/04	1			
10 250101	1			

Sample :H1603				
Allele:A*020101		Allele:A*24020101		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	2	1 未記入 (または-)	2	
2 02	14	2 24	15	
3 0201	7	3 2402	6	
4 0201/02/03/+	6	4 2402/03/04/+	9	
5 0201/02/04/+	1	5 2402/03/05/+	8	
6 0201/02/12/+	1	6 2402/03/08/+	3	
7 0201/04/05/+	1	7 2402/03/13/+	3	
8 0201/04/07/+	11	8 2402/05/07/+	1	
9 0201/07/08/+	1	9 2402/07/09/+	1	
10 0201/07/09/+	10	10 2402/07/09N/+	3	
11 0201/07/15/+	3	11 2402/08/20/+	1	
12 0201/09/11/+	2	12 2402/09	1	
13 0201/09/24/+	2	13 2402/09/11/+	6	
14 0201/12/36	2	14 2402/09/17	1	
15 020101	2	15 2402/09/20/+	1	
16 0206/10/20+	1	16 2402/09N/11N/+	1	
17 2	1	17 2402/11	1	
18 N.D.	1	18 2402/11N/20/+	1	
		19 2402/20	1	
		20 2402/30/31+	1	
		21 24020101	1	
		22 N.D.	1	

Sample :H1605				
Allele:A*0101		Allele:A*020101		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	15	1 未記入 (または-)	40	
2 01	9	2 (*02)	1	
3 0101	5	3 (*0201)	1	
4 0101/02	3	4 (0201)	1	
5 0101/02/03/+	3	5 02	4	
6 0101/02/04/+	1	6 0201	1	
7 0101/02/04N+	1	7 0201/02/03/+	1	
8 0101/02/04N/+	1	8 0201/07/+	1	
9 0101/04	1	9 0201/07/09	1	
10 0101/04/05	1	10 0201/07/09/+	3	
11 0101/04/09	10	11 0201/09/11/+	1	
12 0101/04N/09	4	12 0201/09/24/+	1	
13 010101	2	13 0219/36/37/+	1	
14 0102	1	14 0249	1	
15 1	1	15 2	1	
16 N.D.	14	16 N.D.	11	

Allele:A*2402			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入 (または-)	59	2402/09N/11N/+	2
2 24	3	2402/20	1
3 2402/03/04/+	3	2408	1
4 2402/09	1	2410/22/31/+	1
5 2402/09/11/+	1		

Sample :H1602				
Allele:A*020101		Allele:A*2402		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	2	1 未記入 (または-)	2	
2 02	14	2 24	15	
3 0201	7	3 2402	5	
4 0201/02/03/+	6	4 2402/03/04/+	9	
5 0201/02/04/+	1	5 2402/03/05/+	7	
6 0201/02/07/+	1	6 2402/03/08/+	3	
7 0201/02/12/+	1	7 2402/03/09/+	1	
8 0201/04/05/+	1	8 2402/03/13/+	3	
9 0201/04/07/+	10	9 2402/05/07/+	1	
10 0201/07/09/+	10	10 2402/07/09/+	1	
11 0201/07/15/+	4	11 2402/07/09N/+	3	
12 0201/07/18/+	1	12 2402/08/20	1	
13 0201/09/11/+	2	13 2402/09	2	
14 0201/09/24/+	2	14 2402/09/11/+	6	
15 0201/12/36	2	15 2402/09/17	1	
16 020101	2	16 2402/09/20/+	1	
17 2	1	17 2402/09N/11N/+	1	
18 N.D.	1	18 2402/11	1	
		19 2402/11N/20/+	1	
		20 2402/20	2	
		21 24020101	1	
		22 N.D.	1	

Sample :H1604				
Allele:A*24020101		Allele:A*020101		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	12	1 未記入 (または-)	11	
2 24	12	2 02	10	
3 2402	3	3 0201	5	
4 2402/03/04/+	5	4 0201/02/03/+	4	
5 2402/03/13/+	1	5 0201/02/04/+	1	
6 2402/04/08/+	1	6 0201/07/09/+	6	
7 2402/07/09/+	1	7 0201/07/15/+	2	
8 2402/07/09N/+	2	8 0201/07/18/+	1	
9 2402/09	2	9 0201/09/11/+	2	
10 2402/09/11/+	3	10 0201/09/12	1	
11 2402/09/17	1	11 0201/09/24/+	1	
12 2402/09/20/+	1	12 0201/12/36	1	
13 2402/09N/11N/+	2	13 020101	1	
14 2402/11	1	14 0201?	1	
15 2402?	1	15 0236	6	
16 2410	6	16 2	1	
17 N.D.	14	17 N.D.	14	

Allele:A*0101			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入 (または-)	28	8 0101/04/09	3
2 01	8	9 0101/04N/09	1
3 01/02/24	1	10 010101-4N/06-09?	1
4 0101	2	11 1	1
5 0101/02	2	12 N.D.	14
6 0101/02/03/+	4	13 未定?	1
7 0101/04	1		

Sample :H1606				
Allele:A*250101		Allele:A*3001		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	10	1 未記入 (または-)	10	
2 25	6	2 30	7	
3 25/43/66	1	3 3001	33	
4 2501	34	4 3001/02/03/+	3	
5 2501/02	7	5 3001/08	6	
6 2501/02/03/+	2	6 3001/11	3	
7 2501/03/04/+	1	7 3011	1	
8 2501/04	1	8 N.D.	5	
9 250101	1	9 2402/20	1	
10 N.D.	5			

WS 集会において、このような場合の表記として、判定が出来なかった意味である undefined の略として“undef”を結果として表記し、判定出来ない内容をコメント欄で説明することが適切であるとされた。

⑦ “()”または“?”付き表記

結果表記において、判定結果が明確でないことを意味していると思われる“()”(カッコ)または“?”を付き表記が見られた(例: DRB1*(0101), DRB1*(1501))。このような場合においても、判定が不可能または検査結果が不明確である場合には、結果を

表 2 HLA-B ローカス表記の集計

Sample :H1601			
Allele:B*1801/17N		Allele:B*440301	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入 (または-)	7	1 未記入 (または-)	6
2 18	15	2 44	16
3 1801	8	3 4402/03/07/+	3
4 1801/02/03/+	7	4 4403	7
5 1801/02/05/+	1	5 4403/04/07/+	1
6 1801/03/05	4	6 4403/07	4
7 1801/03/05/+	19	7 4403/07/08/+	1
8 1801/05/06/+	1	8 4403/07/13	1
9 1801/05/08/+	2	9 4403/07/13/+	15
10 1801/05/11/+	2	10 4403/07/26	3
11 1801/05/17N	1	11 4403/07/26/+	5
12 1801/17	2	12 4403/13/26/+	2
13 1801/17N	1	13 4403/26/35/+	1
14 1809	1	14 4403/26/36/+	1
15 1815	1	15 440301	6
		1501/03/05/+	1
		1546/53	1
		35	1

Sample :H1603			
Allele:B*3801		Allele:B*510101	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入 (または-)	7	1 未記入 (または-)	6
2 38	13	2 51	15
3 3801	21	3 5101	7
4 3801/02/04/+	2	4 5101/02/03/+	4
5 3801/02/05/+	1	5 5101/03	1
6 3801/02/08	1	6 5101/03/07/+	5
7 3801/02/08/+	5	7 5101/03/09	1
8 3801/02/09	1	8 5101/03/09/+	17
9 3801/09	19	9 5101/03/11/+	1
10 3802/08	1	10 5101/03/11N/+	1
11 3901/05/+	1	11 5101/07/09/+	1
		12 5101/09/11/+	2
		13 5101/09/11N/+	2
		14 5101/11N	1
		15 5101/11N/27N/+	1
		16 510101	4
		17 510103/07/+	1
		18 5106	1
		19 5121	1
		20 N.D.	1

Sample :H1605			
Allele:B*151101		Allele:B*350101	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入 (または-)	29	1 未記入 (または-)	46
2 (1511)	3	2 35	4
3 15	4	3 35/15	1
4 1508	2	4 3501/03/07/+	1
5 1508/11	2	5 3501/07/11/+	1
6 1508/11/15	1	6 3501/07/40N/+	1
7 1511	10	7 3501/32	1
8 1511/31	3	8 3532	1
9 151101	1	9 5301	1
10 1516/67	1	10 5301/02/03/+	1
11 1531	1	11 N.D.	14
12 N.D.	15		
Allele:B*570101			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入 (または-)	33	6 5701/03	1
2 57	10	7 5701/06	17
3 57/58	1	8 5701/07	1
4 5701	6	9 5701/5801	1
5 5701/02/03/+	1	10 570101	1

Sample :H1602			
Allele:B*151101		Allele:B*350101	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入 (または-)	6	1 未記入 (または-)	6
2 15	10	2 35	15
3 1501/08/11	1	3 3501	7
4 1502/08/11/+	1	4 3501/02/03/+	2
5 1502/11/21/+	1	5 3501/03/06/+	2
6 1508	2	6 3501/03/07/+	23
7 1508/11	14	7 3501/07/11/+	8
8 1508/11/15	4	8 3501/07/27/+	1
9 1508/11/15/+	1	9 3501/07/40N/+	2
10 1511	23	10 3501/42	3
11 151101	9	11 350101	2
		12 3511/21	1

Sample :H1604			
Allele:B*151101		Allele:B*350101	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入 (または-)	17	1 未記入 (または-)	22
2 15	10	2 35	13
3 1502/11/21/+	1	3 3501	4
4 1508	3	4 3501/02/03/+	1
5 1508/11	3	5 3501/03/06/+	1
6 1508/11/15	2	6 3501/03/07/+	6
7 1511	14	7 3501/07/11	1
8 151101	6	8 3501/07/11/+	3
9 1517	1	9 3501/07/11N/+	1
10 N.D.	15	10 3501/07/27/+	1
		11 3501/07/40N/+	1
		12 3501/42	2
		13 3501/5701/+	1
		14 350101	2
		15 3511/21	1
		16 N.D.	12
Allele:B*5701			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入 (または-)	39	9 5701/03/06	1
2 3501/5701/+	1	10 5701/06	6
3 53/57	1	11 5701/07	1
4 5301	1	12 58	1
5 57	10	13 5801	2
6 57/58	1	14 5801/02/04	1
7 5701	3	15 5801/04	2
8 5701/03	1	16 5804	1

Sample :H1606			
Allele:B*1801		Allele:B*440301	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 未記入 (または-)	17	1 未記入 (または-)	16
2 18	8	2 44	9
3 1801	6	3 4402/03/07/+	2
4 1801/02/03/+	3	4 4403	5
5 1801/02/05/+	1	5 4403/07	4
6 1801/03/05	4	6 4403/07/08/+	1
7 1801/03/05/+	18	7 4403/07/13	1
8 1801/05/06/+	2	8 4403/07/13/+	13
9 1801/05/08/+	2	9 4403/07/26	2
10 1801/05/11/+	2	10 4403/07/26/+	6
11 1801/17	2	11 4403/13/26/+	1
12 1801/17N	1	12 4403/26/35/+	1
13 1809	1	13 4403/26/36/+	1
14 N.D.	5	14 440301	5
		15 N.D.	5
Allele:B*?			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 1501/03/05/+	1	3 1546/53	1
2 1503	1	4 35	1

“undef” (undefined) と表記し、コメントでその内容について説明することが適切と思われる。

⑧ 遺伝子座の表記 (HLA 型だけの表記)

HLA-DRB3, DRB4 および DRB5 遺伝子座における結果表記として、遺伝子座の数字を対立遺伝子

(アリル)として表記している例(例: 3, 4, 5)が見られた。2桁レベルでのタイピング結果を、表記したものであるが、区分不可能なアリルも含んでいることから、表記法の「アンビギュイティ (ambiguity) の取扱い」に従い結果を表記をすることが必要がある。

表3 HLA-C ローカス表記の集計

Sample :H1601				
Allele:Cw*120301?		Allele:Cw*1601		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	未記入 (または-)	28	1 未記入 (または-)	36
2	12	11	2 16	8
3	12/14/17	1	3 1601	12
4	1202/03/04+	1	4 1601/02	3
5	1202/03/06/+	2	5 1601/02/04	1
6	1203	3	6 1601/04	3
7	1203/04/05/+	1	7 1601/06	3
8	1203/04/06	2	8 1604	1
9	1203/06	5	9 Cw16	1
10	1203/06/07	4		
11	1203/06/07/+	3		
12	120301	5	1 06/12	1
13	12031/06/07	1	2 06/17	1
14	Cw12	1	3 17	1

Sample :H1602				
Allele:Cw*030301		Allele:Cw*?		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	未記入 (または-)	1	1 未記入 (または-)	35
2	03	9	2 0102	1
3	03(9)	1	3 03	3
4	0301/03	1	4 03/-	1
5	0302/03/04/+	1	5 0304/06	1
6	0303	5		
7	0303/04/05/+	1		
8	0303/11/12/+	5		
9	0303/11/13	1		
10	0303/11/13/+	1		
11	0303/12/13	3		
12	0303/13	5		
13	030301	5		
14	3	1		
15	Cw9	1		

Sample :H1603				
Allele:Cw*0501		Allele:Cw*07		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	未記入 (または-)	29	1 未記入 (または-)	26
2	05	3	2 07	6
3	0501	1	3 0701/02/03/+	4
4	0501/02/03/+	2	4 0702/13/17/+	1
5	0501/03/04	1	5 7	1
6	0501/03/04/+	1	6 Cw7	1
7	0501/03/05	1	7 N.D.	2
8	0501/03/05/+	1		
9	N.D.	2		
Allele:Cw*01?				
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	未記入 (または-)	3	10 0102/05/06	2
2	01	10	11 0102/05/06 and 0103?	1
3	01/08?	1	12 0102/05/06/+	2
4	0102	7	13 0102/06/07/+	1
5	0102/03/04/+	1	14 0102/0701 and 02/07/08	1
6	0102/03/05	1	15 0103 or 0102/05/06/+	1
7	0102/03/05/+	4	16 0303 and 0102	1
8	0102/03/06/+	1	17 1	1
9	0102/03/07/+	2	18 Cw1	1

Sample :H1604				
Allele:Cw*030301		Allele:Cw*0602		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	未記入 (または-)	4	1 未記入 (または-)	12
2	03	7	2 06	10
3	03(9)	1	3 0602	4
4	0301/03	1	4 0602/03/04/+	1
5	0302/03/04/+	1	5 0602/03/07	2
6	0303	4	6 0602/03/07/+	2
7	0303/04/05/+	1	7 0602/04/06/+	4
8	0303/11/12	2	8 0602/07	3
9	0303/11/12/+	4	9 0607	1
10	0303/11/13	3	10 6	1
11	0303/12	1	11 Cw6	1
12	0303/13	4	12 N.D.	1
13	030301	4		
14	3	1		
15	Cw9	1	102	1
16	N.D.	3	120401	2

Sample :H1605				
Allele:Cw*0303		Allele:Cw*0602		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	未記入 (または-)	44	1 未記入 (または-)	39
2	(*03)	1	2 06	7
3	(0303)	1	3 0602	4
4	03	2	4 0602/03/04/+	1
5	0301/03	1	5 0602/03/07	1
6	0303	3	6 0602/03/07/+	2
7	0303/11/12	1	7 0602/07	9
8	0303/11/12/+	2	8 0602/07/10	1
9	0303/11/13	3	9 N.D.	3
10	0303/13	1	10 N.T.	1
11	0304/09	1		
12	N.D.	6		

Sample :H1606				
Allele:Cw*120301?		Allele:Cw*1601		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	未記入 (または-)	36	1 未記入 (または-)	44
2	12	6	2 16	8
3	1202/03/06/+	3	3 1601	1
4	1203	2	4 1601/02	1
5	1203/04/06	1	5 1601/02/04	1
6	1203/06	3	6 1601/04	2
7	1203/06/07	2	7 1601/04/06	1
8	1203/06/07/+	4	8 1601/06	2
9	1203/06/11	1	9 1604	1
10	120301	3	10 N.D.	4
11	12031/06/07	1	11 N.T.	1
12	N.D.	4		
13	N.T.	2	06	1

また、アレル記載欄に何も結果表記をせずに、HLA型(抗原型)DR51, DR52, DR53だけを表記する施設もあった。このことは、Cローカスにおいても、同様な表記が見られ、DNAタイピングの結果をアレル欄に記載する必要がある。表記法における、

以下の記載「2桁レベル(粗分別, low resolution)でタイ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。」に従い「HLA型」だけを表記をし

表4 HLA-DRB1 ローカス表記の集計

Sample :H1601				
Allele:DRB1*0701		Allele:DRB1*1104		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入 (または-)	2	1 未記入 (または-)	3	
2 07	16	2 11	18	
3 0701	17	3 1101	2	
4 0701/02/03/+	3	4 1101/01/10/+	1	
5 0701/03/+	1	5 1101/02/03/+	2	
6 0701/03/04	3	6 1101/02/04/+	3	
7 0701/03/04/+	21	7 1101/03/04/+	1	
8 0701/03/05/+	5	8 1101/04	1	
9 070101	2	9 1101/04/06/+	4	
10 070101/02	1	10 1101/04/10/+	8	
11 7	1	11 1101/04/12/+	1	
		12 1101/04/15/+	5	
		13 1101/10/12/+	1	
		14 1104	13	
		15 1104/06/25/+	2	
		16 1104/06/41/+	1	
		17 1104/1143	1	
		18 1104/43/44	1	
		19 110401	4	

Sample :H1602				
Allele:DRB1*0101		Allele:DRB1*150101		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入 (または-)	2	1 未記入 (または-)	2	
2 01	16	2 15	17	
3 0101	19	3 1501	20	
4 0101/02/04/+	6	4 1501/02/03/+	9	
5 0101/02/1/04/+	1	5 1501/02/04	1	
6 0101/04/05	3	6 1501/02/04/+	15	
7 0101/04/05/+	15	7 1501/03/06/+	1	
8 0101/04/05/07/+	1	8 1501/05/09/+	1	
9 0101/05/07	2	9 1501/06/07/+	2	
10 0101/05/07/+	3	10 150101	4	
11 0101/07	1			
12 0101/08	1			
13 0102/04/05/+	1			
14 1	1			

Sample :H1603				
Allele:DRB1*0101/04/05		Allele:DRB1*-		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入 (または-)	2	1 未記入 (または-)	68	
2 01	16	2 - or 0106/09	1	
3 0101	19	3 01/-	1	
4 0101/02/04/+	5	4 0101/04/05/+	1	
5 0101/02/1/04/+	1	5 010102	1	
6 0101/04/05	3			
7 0101/04/05/+	17			
8 0101/05/07	2			
9 0101/05/07/+	3			
10 0101/08	1			
11 0101802/04/+	1			
12 0102/04/05/+	1			
13 1	1			

Sample :H1604				
Allele:DRB1*0101		Allele:DRB1*1501		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入 (または-)	8	1 未記入 (または-)	29	
2 01	11	2 15	12	
3 01/07/15	1	3 1501	13	
4 0101	10	4 1501/02/03/+	3	
5 0101/02/04/+	2	5 1501/02/04/+	10	
6 0101/04/05	3	6 1501/05/09/+	1	
7 0101/04/05/+	10	7 1501/06/07/+	2	
8 0101/05/07	2	8 150101	2	
9 0101/05/07/+	3			
10 0101/07	1			
11 0102/04/05/+	1			
12 1	1			
13 N.D.	18			
14 不明?	1			

Allele:DRB1*0701				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入 (または-)	35	7 0701/03/05/+	1	
2 07	8	8 070101	1	
3 0701	6	9 07011/03/04/+	1	
4 0701/02/03/+	1	10 7	1	
5 0701/03/04	1	11 N.D.	12	
6 0701/03/04/+	4			
		12 0401/02/03/+	1	

Sample :H1605				
Allele:DRB1*0101		Allele:DRB1*0701		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入 (または-)	20	1 未記入 (または-)	17	
2 (0101)	1	2 07	10	
3 01	8	3 0701	8	
4 0101	7	4 0701/02/03/+	2	
5 0101/02/04/+	2	5 0701/03/+	1	
6 0101/04/05/+	3	6 0701/03/04	4	
7 0101/05/07	2	7 0701/03/04/+	14	
8 0101/05/07/+	1	8 070101	2	
9 0106	2	9 07011/03/04/+	1	
10 0106/09	6	10 N.D.	12	
11 N.D.	18	11 N.T.	1	
12 N.T.	1			
13 不明?	1			

Allele:DRB1*1501				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入 (または-)	48	6 1501/02/04/+	5	
2 (1501)	2	7 1601/03/05/+	1	
3 15	6	8 1601/03/05/+?	1	
4 1501	6	9 1405/02/1408/+	1	
5 1501/02/03/+	2			

Sample :H1606				
Allele:DRB1*0701		Allele:DRB1*1104		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入 (または-)	8	1 未記入 (または-)	11	
2 07	12	2 11	11	
3 0701	15	3 1101	2	
4 0701/02/03/+	2	4 1101/02/04/+	1	
5 0701/03/+	1	5 1101/03/04/+	1	
6 0701/03/04	3	6 1101/04	1	
7 0701/03/04/+	20	7 1101/04/06/+	1	
8 0701/03/05/+	2	8 1101/04/10/+	10	
9 070101	1	9 1101/04/15/+	5	
10 070101/02	1	10 1101/10/12/+	2	
11 N.D.	6	11 1104	12	
12 N.T.	1	12 1104/06/25/+	1	
		13 1104/06/41/+	1	
		14 1104/43	2	
		15 1104/43/44	1	

Allele:DRB1*?				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 未記入 (または-)	70	16 110401	3	
2 1405/02/1408/+	1	17 1110/12	1	
3 1202/1501	1	18 N.D.	5	
		19 N.T.	1	

たと思われるが、QCWS のデータとしては、アリルも表記すべきである。

⑨ アリルの記載方法

対立遺伝子を意味する表記は、必ず "*" (アステ

リスク)を用いることになっており、HLADRB3-02 等のような "-" (ハイフン)を用いることは間違っている。

表 5 HLA-DRB3/4/5 および DQA1 ローカス表記の集計

Sample :H1601					
Allele:DRB3*0202/12		Allele:DRB4*0101/03/06			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数	
1	*01/*02/*03	1	1	01	12
2	01	1	2	01/02	5
3	01/02/03	7	3	01/02/03	1
4	0101/02/03/+	1	4	0101/02/03+	1
5	0101/0201/+	1	5	0101/02/03/+	10
6	02	2	6	0101/02/05/+	1
7	02/03	7	7	0101/0201	1
8	0201/02/03/+	7	8	0101/03/04/+	1
9	0202	6	9	010101	1
10	0208	1	10	4	1
11	3	1	11	B4-01	1
12	B3-02	1			

Sample :H1602					
Allele:DRB5*0101		Allele: -			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数	
1	01	3	1	未記入 (または-)	34
2	01/02	12	2	DRB5*01/02	1
3	0101	6	3	N.D.	1
4	0101/0105/09/+	1			
5	0101/02/03/+	4			
6	0101/0202	1			
7	0101/05/09	3			
8	0101/05/09/+	4			
9	5	1			
10	B5-01	1			

Sample :H1603					
Allele:DRB4*0101/03/06		Allele:DRB5*0101			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数	
1	未記入 (または-)	6	1	未記入 (または-)	2
2	01	9	2	01	4
3	01/02	4	3	01/02	6
4	0101/02/03/+	7	4	0101	3
5	0101/02/05/+	1	5	0101/02/03/+	4
6	01030102N	1	6	0101/0202	1
7	4	1	7	0101/05/09	2
8	B4-01	1	8	0101/05/09/+	6
9	N.D.	6	9	5	1
			10	B5-01	1
			11	N.D.	6

Sample :H1604					
Allele:DRB3*0202/12		Allele:DRB4*0101/03/06			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数	
1	未記入 (または-)	4	1	未記入 (または-)	5
2	01	1	2	01	8
3	01/02/03	5	3	01/02	7
4	02	1	4	01/02/03	1
5	02/03	9	5	0101/02/03+	1
6	0201/02/03/+	6	6	0101/02/03/+	6
7	0202	3	7	0101/02/05/+	1
8	0208	1	8	0101/03/04/+	1
9	B3-02	1	9	B4-01	1
10	N.D.	3	10	N.D.	3
11	N.T.	2	11	N.T.	2

Sample :H1605					
Allele:DRB4*0101/03/06		Allele:DRB5*0101			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数	
1	未記入 (または-)	7	1	未記入 (または-)	15
2	01	8	2	(0101)	1
3	01/02	5	3	01	3
4	0101/02/03/+	1	4	01/02	4
5	0101/02/03/+	6	5	0101	2
6	0101/02/05/+	1	6	0101/05/09	1
7	B4-01	1	7	0101/05/09/+	2
8	N.D.	6	8	B5-01	1
9	N.T.	1	9	N.D.	6
			10	N.T.	1

Sample :H1606					
Allele:DQA1*0201		Allele:DQA1*0501/03/05			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数	
1	0201	6	1	0501	2
			2	0501/02/03/+	1
			3	0501/03/05	2
			4	0505	1

Sample :H1602					
Allele:DQA1*0101/04/05		Allele:DQA1*0102/03			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数	
1	0101	1	1	未記入 (または-)	5
2	0101/02/04	1	2	0102	1
3	0101/02/04/+	3			
4	N.D.	1			

Sample :H1603					
Allele:DQA1*0101/04/05					
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数	
1	0101				
2	0101/02/04				
3	0101/02/04/+				
4	N.D.				

Sample :H1604					
Allele:DQA1*0101/02/03/+		Allele:DQA1*0201			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数	
1	0101/02/04	1	1	未記入 (または-)	2
2	0101/02/04/+	3	2	0201	2
3	N.D.	2	3	N.D.	2

Sample :H1605					
Allele:DQA1*0101/02/03/+		Allele:DQA1*0201			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数	
1	未記入 (または-)	1	1	未記入 (または-)	1
2	(0101/02/04/+)	1	2	0201	3
3	0101/02/04/+	2	3	N.D.	1
4	N.D.	1	4	N.T.	1
5	N.T.	1			

Sample :H1606					
Allele:DQA1*0201		Allele:DQA1*0501/03/05			
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数	
1	未記入 (または-)	1	1	未記入 (または-)	1
2	0201	4	2	0501	1
3	N.T.	1	3	0501/02/03/+	1
			4	0501/03/05	2
			5	N.T.	1

2.2. HLA 型の表記の問題点

HLA 型 (HLA 抗原型)の表記については、10 施設で HLA 型が表記されておらず、3 施設で HLA 型だけが表記され、アレルの表記がされていなかった。

HLA-A ローカスの HLA 型表記において、A25/

43/66 と表記されていたが、A10 と表記することがより適切であると思われる。また、A-2、A-25、A-30 等の“-” (ハイフン)を用いる表記は不適切である。

HLA-B ローカスの HLA 型表記では、概ね問題はないが、アレルが B*15 と表記されているにも関

表6 HLA-DQB1 および DPB1 ローカス表記の集計

Sample :H1601				
Allele:DQB1*0201/02		Allele:DQB1*0301/+		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 02	10	1 03	8	
2 0201	4	2 0301	9	
3 0201/02	3	3 0301/04/09	2	
4 0201/02/03	9	4 0301/04/09/+	6	
5 0201/02/03/	1	5 0301/09	2	
6 0201/02/03/+	1	6 0301/09/13	4	
7 0202	4	7 030101	1	
8 2	2	8 3	1	
		9 7	1	

Sample :H1602				
Allele:DQB1*0501		Allele:DQB1*0602/11/20		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 05	9	1 未記入 (または-)	1	
2 05/06	1	2 06	10	
3 0501	13	3 0601/02/03/+	7	
4 0501/02/03/+	7	4 0602	8	
5 050101	1	5 0602/03	1	
6 5	2	6 0602/11/15/+	1	
7 N.D.	1	7 0602/11/16	2	
		8 0602/1101/15/+	1	
		9 0602/111/15/+	1	
		10 6	2	

Sample :H1603				
Allele:DQB1*0501		Allele: -		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 05	10	1 未記入 (または-)	32	
2 0501	14	2 0501/02/03/+	1	
3 0501/02/03/+	7	3 9	1	
4 050101	1			
5 5	2			

Sample :H1604				
Allele:DQB1*0501		Allele : DQB1*0602/11/20		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	1	1 未記入 (または-)	4	
2 05	7	2 06	8	
3 05/06	1	3 0601/02/03/+	6	
4 0501	11	4 0602	6	
5 0501/02/03/+	6	5 0602/11/15/+	1	
6 5	2	6 0602/11/16	2	
7 N.D.	6	7 0602/1101/15/+	1	
		8 0602/111/15/+	1	
		9 6	2	

Allele:DQB1*0303				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	23	4 0303/12	1	
2 03	2	5 09	1	
3 0303	5	6 3	1	
0201	1			

Sample :H1605				
Allele:DQB1*0303		Allele: -		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	17	1 未記入 (または-)	8	
2 03	4	2 05	6	
3 0303	6	3 0501	6	
4 0303/06/12	1	4 0501/02/03/+	3	
5 0303/12	3	5 05031	1	
6 03032	2	6 N.D.	8	
7 0306	1	7 N.T.	2	

Allele:DQB1*0602/11/20				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	17	6 0602/08/11/+	1	
2 (0602)	1	7 N.D.	6	
3 06	2	8 N.T.	2	
4 0601/02/03/+	2			
5 0602	2	0201	1	

Sample :H1606				
Allele:DQB1*0201		Allele:DQB1*0301/+		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	5	1 未記入 (または-)	5	
2 02	8	2 03	5	
3 0201	4	3 0301	9	
4 0201/02	1	4 0301/04/09	1	
5 0201/02/03	7	5 0301/04/09/+	2	
6 0201/02/03/+	1	6 0301/09	2	
7 0202	2	7 0301/09/13	4	
8 N.D.	4	8 N.D.	4	
9 N.T.	2	9 N.T.	2	

Sample :H1601				
DPB1*0301		Allele:DPB1*0601		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 0301	5	1 0601	1	
		2 0601	3	
		3 0601/2001	1	

Sample :H1602				
Allele:DPB1*0201		Allele:DPB1*0402		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 0201	3	1 0402	4	
2 0201/3201	1	2 0402/2301	1	
3 020102	1			

Sample :H1603				
Allele:DPB1*0201		Allele: -		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 0201	3	1 未記入 (または-)	4	
2 020102	1	2 0402	1	
3 02012	1			

Sample :H1604				
Allele:DPB1*0201		Allele:DPB1*0402		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 0201	1	1 0402	3	
2 0201/3201	1	2 0402/2301	1	
3 N.D.	6	3 N.D.	6	

Allele:DPB1*1301				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 0102	2			

Sample :H1605				
Allele:DPB1*0402		Allele:DPB1*1301		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	1	1 未記入 (または-)	1	
2 0401/02	1	2 1301	3	
3 0402	2	3 N.D.	1	
4 N.D.	1			

Sample :H1606				
Allele:DPB1*0301		Allele:DPB1*0601		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 未記入 (または-)	1	1 未記入 (または-)	1	
2 0301/2901	1	2 0601	2	
3 0303	2	3 0601/2001	1	
4 N.D.	1	4 N.D.	1	

ならず, HLA 型は B75 と表記されていた。HLA 型を B75 と判定可能である場合に, アリルを B*15 と表記することは間違いであり, DNA タイピングの詳細をアリル欄に表記することが必要である。

HLA-DRB1 ローカスのアリル表記で, HLA-

DRB1*1 および HLA-DRB1*7 といった, HLA 型の表記(“0”ゼロが抜けている)を用いているのは, 不適切である。また, HLA 型では DR-1, DR-7 といった“-” (ハイフン)を用いた表記は, HLA 型表記としては不適切である。