

# 第9回 HLA-QC ワークショップレポート

## 第9回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過—

木村彰方<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>10)</sup>, 太田正穂<sup>3)</sup>, 柏瀬貢一<sup>4)</sup>, 小林 賢<sup>5)</sup>, 酒巻建夫<sup>6)</sup>,  
佐田正晴<sup>7)</sup>, 田中秀則<sup>4)</sup>, 中島文明<sup>8)</sup>, 成瀬妙子<sup>9)</sup>, 丸屋悦子<sup>10)</sup>, 安波道郎<sup>1,2)</sup>  
(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 9 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 16 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。特に、従来から行われている DNA タイピング QC (DNA-QC) に加えて、昨年度に大会主催で抗体ワークショップとして行われた抗体を用いた QC (抗体 QC) を、本年度から学会主催で実施することとした。これに伴って QCWS 部会を DNA-QC 部門と抗体 QC 部門の 2 部門構成とした。平成 16 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 181 名 (70 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 7 月のデータ送付締め切りまでに、69 施設から解析

データが収集された。それらのデータは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とりまとめ、QCWS 集会で用いる資料を作成した(表 1)。

### 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、DNA-QC 部門は (1) 正確なタイピング、(2) 少量試料からのタイピング、(3) タイピング精度と血清対応型への読み替え、抗体 QC 部門は (4) 方法論による特異性、精度に関する比較をテーマとした。医療業務(臨床検査など)以外で行われるヒト試料解析は、研究の範疇に入るため、国が定める種々の研究指針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おくか、適切な組織によって全体の研究計画の倫理審査を受ける必要がある。そのため、日本組織適合性学会内に倫理問題検討委員会を設置し、これら試料を用いた研究計画の倫理的側面を検討いただいた。また、今回の QCWS

表1 第8回 QCWS の実施経過

平成16年9月	QCWS 部会において第9回 QCWS の方針決定 DNA-QC 部門：1) 日常的に遭遇しない珍しいタイプ、2) 新技術、 3) タイピング精度と血清対応型への読み替え 抗体 QC 部門：4) 方法論による特異性、精度に関する比較
平成16年11月	第9回 QCWS 案内の作成、 「MHC」および HP への掲載
平成17年1月	倫理問題検討委員会において、実施計画について審議
平成17年3月	参加申し込み：70 施設（181名） 8th QCWS よりの継続参加施設：66、新規参加施設：4 DNA-QC 参加：65 施設、抗体 QC 参加：44 施設
平成17年4月-5月	QCWS 部会内各部門において具体的なサンプルの決定： 1) 外国人由来の細胞株、2) 細胞を貼布したろ紙の使用、 3) A2, B15 サブタイプの使用、4) 市販抗血清の使用（25 本の候補から LCT によるプレスクリーニングにより選定） QCWS 部会(H17.5.2)にて解析担当者の決定、QCWS 集会の方針決定
平成17年4月下旬-5月中旬	QCWS サンプルの配布、 倫理問題検討委員会での審議に基づき、同意書を取得
平成17年7月上旬-中旬	データ回収締め切り
平成17年7月-8月	QCWS データ解析
平成17年9月12日	QCWS 集会での発表データに関する打ち合わせ会
平成17年9月中旬	QCWS 集会用資料配布：70 施設（181名）

表2 使用した細胞株とその HLA 型

Cell ID	A	B	C	DRB1
Cell#1	2403, 1101	1502 (B75), 5502	08, 1203	nd
Cell#2	0203, 2901	1519 (B76), 0702	0401, 15	nd
Cell#3	0204	5101	1502	1602
Cell#4	0216, 0301	5101	0704, 15	1104, 1201
Cell#5	0201	1801	0701	1201
Cell#6	2402	0702	0702	0101

表3 QCWS サンプル(抗体部門)の特異性

サンプル ID	形状	特異性	LCT 力値	備考
SH1701	抗血清	A2 A203 A210	x1	x2 → A2
SH1702	抗血清	B8	x1-2	
SH1703	抗血清	B57 B58	x1	
SH1704	抗血清	(-)		flowPRA Scr. class I (+) class II (+)
SH1705	抗血清	B7 B48 B60 B81	x1-16	
SH1706	抗血清	B13 B60 B61	x1	

では、研究倫理指針の対象外とされるヒト試料(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(表2) および市販抗血清(表3) を用いた。

なお、用いた血清は、25 本の血清につき、LCT 法

でプレスクリーニングして 6 本を以下のような基準で選定したものである。① 単一特異性、② IgM 抗体が期待できる、③ LCT 法で不明な抗体、④ 似通った抗原エピトープを認識している抗体 2 種類、⑤ DNA サンプルの細胞との反応が期待できる抗体。

配布したサンプルは DNA-QC、抗体 QC いずれも 6 種類ずつであり、DNA-QC のサンプルは表4、抗体 QC のサンプルは表3 のとおりである。

表4 QCWS サンプル(DNA 部門)の構成

サンプル ID	形状	構成
H1701	DNA	Cell#1 より 50ng/microL に調製
H1702	DNA	Cell#2 より 50ng/microL に調製
H1703	DNA	Cell#3 より 50ng/microL に調製
H1704	DNA	Cell#4 より 50ng/microL に調製
H1705	細胞	Cell#5 をろ紙 (FTA カード) に付着
H1706	細胞	Cell#6 をろ紙 (FTA カード) に付着

### 3. 参加者・参加施設

参加者は総数 181 名であり、以下の 70 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、北海道大学医学部付属病院、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、One Lambda、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、東海大学医学部付属病院、東海大学医学部(部署 1)、東海大学医学部(部署 2)、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、株式会社ビー・エム・エル、防衛医科大学校、信州大学医学部、静岡県立総合病院、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、三重大学医学部付属病院、三重県赤十字血液センター、大阪赤十字血液センター(部署 1)、大阪赤十字血液センター(部署 2)、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、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、高知医療センター、愛媛県立衛生環境研究所、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、独立行政法人国立病院機構長崎医療センター、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、G&G サイエンス株式会社、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(以上のべ 70 施設、郵便番号順)

### 4. まとめ

QCWS は組織適合技術者認定制度委員会の担当となつたため、昨年度に引き続き、認定制度の主旨にそつた試料の構成や選択を行い、QCWS 集会の前に試料の構成を公表し、参加者自身が QCWS 集会までに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9回 HLA-DNA タイピング QC ワークショップレポート —クラスIおよびクラスII 総合判定データ解析—

木村彰方<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>10)</sup>, 太田正穂<sup>3)</sup>, 柏瀬貢一<sup>4)</sup>, 小林 賢<sup>5)</sup>, 酒巻建夫<sup>6)</sup>,  
佐田正晴<sup>7)</sup>, 田中秀則<sup>4)</sup>, 中島文明<sup>8)</sup>, 成瀬妙子<sup>9)</sup>, 丸屋悦子<sup>10)</sup>, 安波道郎<sup>1,2)</sup>

(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. はじめに

昨年までは、総合判定データ解析をクラスIとクラスIIを分けて解析を行っていたが、今回のQCのワークショップより一つにまとめて行った。本稿ではA, B, C および DRB1 ローカスの正解率を中心として検討を行った。なお、参加施設、DNA ソースの情報等は他の稿を参考願いたい。

## 2. 検討方法

- 以下の項目について解析を行った。
- 2.1. 検査方法別の検査結果報告施設数
  - 2.2. ローカス別の検査結果報告施設数
  - 2.3. 検査方法およびローカス別の検査結果報告施設数
  - 2.4. 使用検査方法数別の検査結果報告施設数
  - 2.5. クラスIの正解率
  - 2.6. クラスIIの正解率

## 3. 結果および考察

- 3.1. 検査方法別の検査結果報告施設数

表1に検査方法別の報告数を示した。データを提出した65施設の内、49の施設がSSO法を使用していた。SSP法は27施設により使用されていたが、その内5施設はろ紙検体について、「未記入」または「判定不能」と記されていた。なお、昨年までRSCA

法を用いた施設があったが、今年はゼロであった。

### 3.2. ローカス別検査の結果報告施設数

表2にローカス別の報告数を示した。データを提出した65施設すべてがDRB1の検査を行っていた。A ローカスおよびB ローカスの両方を行っていた施設は63施設であった。また、DQB1 および DPB1 はそれぞれ5および4施設であった。

表1 検査方法別

検査方法	報告数
SSO	49
SSP	27
SBT	8
RFLP	5
SSCP	2

表2 ローカス別

ローカス	報告数
AB	63
C	36
DRB1	65
DRB3/4/5	31
DQA1	5
DQB1	28
DPB1	4

表3 検査方法およびローカス別

ローカス 検査方法	AB C DRB1 DRB3/4/5 DQA1 DQB1 DPB1	AB C DRB1 DRB3/4/5 DQB1	AB C DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	AB C DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	AB C DRB1 DQB1 DPB1	AB C DRB1 DQB1 DPB1	AB C DRB1 DRB3/4/5 DQB1	AB DRB1 DRB3/4/5	AB DRB1 DRB3/4/5	AB DRB1	DRB1	合計
SSP		6				3		1	3			13
SSO		1	1		1	3	7		11	7	1	32
SBT						2	1		1		1	5
SSP+SSO		3					1	1	1	1		7
SSO+RFLP		1							1			2
SSO+SBT							1					1
SSP+SSO+SBT			1			1						2
SSP+SSO+SBT +RFLP				1								1
SSP+SSO+SSC P+RFLP	1											1
SSP+SSO+SBT +SSCP+RFLP				1								1
合計	1	11	2	2	1	9	10	2	17	8	2	65

### 3.3. 検査方法およびローカス別の検査結果報告施設数

表3に検査方法およびローカス別の報告数を示した。データを提出した65施設の内、11施設がSSOを用い A, B, DRB1, DRB3/4/5 の検査を行っていた。また、ローカスの組み合わせでは、A, B, DRB1, DRB3/4/5 が17施設と最も多かった。

### 3.4. 使用検査方法数別の検査結果報告施設数

表4に使用検査方法別の報告数を示した。1法だけ行っている施設が48と最も多く、5法を用いて検査を行った施設が1施設あった。

### 3.5. クラスIの正解率

表5から表7にクラスIの正解率を示した。AおよびBローカスにおいては、H1702のBローカス(low resolutionの72.4%)を除いてすべて90%以上の正解率が得られた。H1702はB\*1519を保有するサンプルで本来は2桁をB15と記載すべきところをB62となっているケースが多かった。Cローカスのlow resolutionにおいて6サンプル中4サンプルが70%台の正解率であった。ミスアサインのほとんどがSSPによるものであった。

### 3.6. クラスIIの正解率

表8にクラスIIの正解率を示した。H1704のhigh resolutionを除きすべてのサンプルにおいて90%以上の正解率が得られた。H1704のミスアサインの

表4 使用検査方法数別

使用検査方法数	報告数
1法	48
2法	12
3法	2
4法	2
5法	1

表5 Aローカス・正解率

QC ID	HLA型	DNA型	Low			High/Middle		
			報告数	正解数	正解率	報告数	正解数	正解率
H1701	A2403 (A24) A11	*2403 *1101	58	57	98.2	51	51	100
H1702	A203(A2) A29	*2023 *2901	58	54	93.1	52	49	94.2
H1703	A2	*0204 -	57	56	98.2	50	47	94.0
H1704	A2 A3	*0216 *0301	58	55	94.8	50	45	90.0
H1705	A2	*0201	46	45	97.8	44	42	95.5
H1706	A24	*2402 -	45	45	100	43	43	100
合計および平均			322	312	96.9	290	277	95.5

内、RELIを用いたケースが多かった。

以上、各項目について解析を行ったが、紙面の関係上詳細については方法別やテーマ別の解析データ

表 6 B ローカス・正解率

QC ID	HLA型	DNA型	Low			High/Middle		
			報告数	正解数	正解率	報告数	正解数	正解率
H1701	B75(B15) B55	*1502 *502	58	55	94.8	51	51	100
H1702	B7 B76(B15)	*0705 *1519	58	42	72.4	53	50	94.3
H1703	B51 -	*5101 -	57	54	94.7	50	49	98.0
H1704	B51 -	*5101 -	58	57	98.3	51	51	100
H1705	B18 -	*1801 -	46	46	100	44	44	100
H1706	B7 -	*0702 -	45	45	100	42	42	100
合計および平均			322	299	95.9	291	287	98.6

を参考願いたい。今年も表記によるミスアサインと思われるケースも少なくなかった。造血幹細胞移植などに HLA タイピングが重要な検査として位置づけられている現状から、検査の正確性を高めることは必須と考えられる。いかに正解率を 100% に近づけるか、未だ課題が残されていると思われる。

表 7 C ローカス・正解率

QC ID	(HLA型)	DNA型	Low			High/Middle		
			報告数	正解数	正解率	報告数	正解数	正解率
H1701	Cw8 (Cw12)	*0801 *1203	9	7	77.8	27	25	92.6
H1702	Cw4 (Cw15)	*0403 *1505	7	5	71.4	29	26	89.7
H1703	(Cw15)	*1502 -	9	7	77.8	26	26	100
H1704	Cw7 (Cw15)	*0704 *1502	7	5	71.4	29	28	96.6
H1705	Cw7 -	*0701 -	3	3	100	21	21	100
H1706	Cw7 -	*0702 -	3	3	100	19	19	100
合計および平均			38	30	78.9	151	145	96.0

表 8 DRB1・正解率

QC ID	HLA型	DNA型	Low			High		
			報告数	正解数	正解率	報告数	正解数	正解率
H1701	14 (6) 15 (2)	*1405 *1501	58	57	98.2	55	54	98.2
H1702	10 15 (2)	*1001 *1502	58	57	98.2	55	53	96.4
H1703	16(2) -	*1602 -	57	52	91.2	56	53	94.6
H1704	11 (5) 12 (5)	*1104 *1201	57	52	91.2	52	43	82.7
H1705	12 -	*1201 -	45	43	95.6	44	41	93.2
H1706	1 -	*0101 -	45	45	100	43	43	100
合計および平均			320	306	95.6	305	287	94.1

## 第9回 HLA-QC ワークショッピングレポート 方法論別データ検討報告—SSP 法—

木村彰方<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>10)</sup>, 太田正穂<sup>3)</sup>, 柏瀬貢一<sup>4)</sup>, 小林 賢<sup>5)</sup>, 酒巻建夫<sup>6)</sup>, 佐田正晴<sup>7)</sup>, 田中秀則<sup>4)</sup>, 中島文明<sup>8)</sup>, 成瀬妙子<sup>9)</sup>, 丸屋悦子<sup>10)</sup>, 安波道郎<sup>1,2)</sup>  
(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. はじめに

今年度の QC ワークショップにおける PCR-SSP 法の解析については、昨年度と同様にキット別で実施した。また、同じキットで 2 施設以下しか実施していない場合には、評価が難しいためにそのキット

を解析から除外した。本年度のデータを見ると、昨年度と同一のロットがかなりの施設で使用されていくことから、昨年度との比較検討も必要に応じて行うこととした。

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

このキットを使用して QC ワークショップに参加されたのは 8 施設であったが、かなりの施設で偽陰性や偽陽性反応を示していた。8 施設で使用された 29 トレー中に偽反応が全くなかったのが 19 トレーで、偽陰性または偽陽性が一つ以上あったのが 10 トレーであった。すなわち、3 回検査するとその内の 1 回に偽反応が見られるという計算になる。One Lambda 社から提供されているデータによれば、このキットに含まれるプライマーセットは偽陰性反応も偽陽性反応も示さないことになっている。しかしながら、何故か QC ワークショップにおいて毎回のようにこのキットでは他のキットに比べて、このような偽反応が多く見かけられる。このキットは、一枚のトレーで HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ のすべてがタイプできるように設計されている。そのため、他のキットに比して無理な設計になっていることから、一種類のプライマーセットだけでアリルタイプを決めなければならないという特性をもっている。そのことから、一つの偽反応によって、本来は存在しないアリルが同定されたり、存在するはずのアリルが同定されなかったり、ということが生じることになる。今回の QC ワークショップにおいてもクラス I で 11 アリル、クラス II で 4 アリルが同定されなかったり、余分に同定されたりしていた。そのなかでも特徴的なのがサンプル H1704 の HLA-DRB1\*1201 が 7 施設中 4 施設で同定できていなかった(一施設は別のキットを使用しているため同定されていたが、反応は陰性であった)。ここで使用されているプライマーセットは、Micro SSP 2L や Micro SSP ABDR のものと同一であると考えられるが、これらのキットにおいては偽陰性反応が全く見られていなかった。これらのことまとめると、このキットを使用している人々には、技術的な問題を抱えている方がいるのではないかと思われた。

このキットは日本人に特化してつくられているため、サンプル H1702 の HLA-A\*2901 のようなアリルを同定するためのプライマーセットが用意されていないという弱点がある。

判定表に記載することが難しいかもしれないが、サンプル H1701 と H1703 の C 遺伝子座については、2 種類の組み合わせが考えられるので、そのような記載またはコメントを行うべきであると思われた。サンプル H1701 は反応パターンから、Cw\*0801/02/03/+ と Cw\*1202/1404/+ のヘテロの組み合わせか、Cw\*0805 と Cw\*0603/1205/+ のヘテロの組み合わせの 2 通りが考えられるので、アリルを同定する場合は、他の方法論を使用して区別させる必要がある。また、サンプル H1703 は反応パターンから、Cw\*1502/05/06/+, - という場合と、Cw\*1502/05/06/+ と Cw\*0314 のヘテロという場合が考えられる。現在の PCR-SSP 法による HLA アリルの同定は反応パターンがかなり複雑化しているので、できる限り正しいアリルを判定するためにコンピューターを使用することが望まれる。

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

偽陰性や偽陽性反応がかなり見られたが、何れも共通する施設から提出されたものであり、プライマーセットの問題というより、技術的な問題の方が大きいのではないかと思われる。それ以外に問題となるような反応は見あたらなかった。また、今年度と昨年度で同一のロットが使用されていたが、昨年度多く見られた偽反応は今年度みられず、反応性が遙かに向上していた。

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

このキットについては、偽反応がなく、アリルの同定も全く問題点が見られなかった。このキットについては昨年度も反応性に問題点がみられていない。このキットはクラス II 専用であり、クラス I に比してクラス II の反応条件が緩やかなことから PCR 反応に無理がなく、このような結果を生み出しているのかもしれない。

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

このキットについては、偽反応がなく、アリルの

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

卷之三

Reactions

H1704 fractions

## 1 Micro SSP Japanese Class I and Class II ABCDRDQ DNA Typing Tray (Micro SSP JPN)

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

Reactions														Local determinations				HLA-C					
H1701		HLA-A														HLA-C				HLA-C			
Lab #	Lot #	8	9	15	29	41	45	47	55	57	59	61	78	80	88	89	90	91	B*1502	B*5502	Cw*08	Cw*1203	
D-040	005	6	6	6	8	6	8	8	8	6	4	3	1	8	A*1101	H12	G12	F12	A*1101	A*2403	Cw*12	Cw*1203	
D-041	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1	6	1101	02/2034+	A*1111	A*24	B*15	B*55	Cw*08	Cw*12	
D-048	005	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	8	1	6	1101	02/2034+	A*1101	02/2034+	B*1502	B*5502	Cw*08	Cw*12	
D-056	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1	6	1101	02/2034+	A*1101	02/2034+	B*1502	B*5502	Cw*0712	Cw*1203/04/06	
D-065	005	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	8	1	8	1101	02/2034+	A*1101	02/2034+	B*1502	B*5502	Cw*0712	Cw*1203/04/06	
D-037	04A	8	6	4	6	6	8	8	8	8	8	8	1	8	A*1111	A*24	B*1502	B*5502	Cw*0712	Cw*1203/04/06	Cw*0801/02/034+	Cw*1203/04/06+	

Recommended notations: A\*1101/02/2034+

Reactions														Local determinations				HLA-C					
H1702		HLA-A														HLA-C				HLA-C			
Lab #	Lot #	4	16	31	32	41	42	43	48	60	74	78	82	84	85	86	93	A*2801	B*0705	B*1519	Cw*0401	Cw*16	
D-009	005	8	8	8	5	8	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	02801/02/034+	02801/02/034+	0705/06	0401/02/034+	0401/02/034+	1504/05/064+	1504/05/064+
D-011	005	6	6	6	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	1	6	2	29	7	76	4	15	
D-040	005	4	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	A*02	B*07	B*15	Cw*04	Cw*15		
D-041	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	02801/02/034+	02801/02/034+	0705/06	0401/03/04+	0401/03/04+	1504/05/064+	1504/05/064+
D-048	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	02801/02/034+	02801/02/034+	0705/06	0401/03/04+	0401/03/04+	1504/05/064+	1504/05/064+
D-054	005	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6	6	02801/02/034+	02801/02/034+	0705/06	0401/03/04+	0401/03/04+	1504/05/064+	1504/05/064+
D-056	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	02801/02/034+	02801/02/034+	0705/06	0401/03/04+	0401/03/04+	1504/05/064+	1504/05/064+
D-065	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	A*0201/02/034+	B*1512/04/19	1512/14/19	Cw*0401/03/04+	Cw*1504/05/064+	Cw*1504/05/064+	
D-037	04A	8	8	8	6	8	8	8	6	8	8	6	8	6	6	6	A*1512/04/19	B*1512/04/19	B*1512/04/19	Cw*0401/03/04+	Cw*1504/05/064+	Cw*1504/05/064+	

Recommended notations: A\*0201/02/034+

Reactions														Local determinations				HLA-C					
H1703		HLA-A														HLA-C				HLA-C			
Lab #	Lot #	4	26	27	28	29	30	60	77	82	88	90	93	96	A*0204	B*1501	B*5101	B*5102	Cw*0704	Cw*15	Cw*0704	Cw*15	
D-009	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	02801/02/034+	-	-	-	1502/05/074+	-	-	-	
D-011	005	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	1	1	2	-	51	-	15	-	-	-	
D-040	005	8	8	8	6	4	8	6	4	8	6	4	6	6	A*02	B*51	-	Cw*15	Cw*15	Cw*0704	Cw*15	Cw*15	
D-041	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	02801/02/034+	-	5101/02/034+	nd	1502/04/054+	-	-	-	
D-048	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	A*0201/02/034+	-	B*5101/02/034+	-	Cw*15	-	-	-	
D-056	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	02801/02/034+	-	5101/02/034+	-	1502/07/08	-	-	-	
D-065	005	8	8	8	6	8	8	6	8	1	8	8	1	8	A*0201/02/034+	-	B*5101/02/034+	-	Cw*1502/07/08	-	-	-	

Recommended notations: A\*0201/02/034+

Reactions														Local determinations				HLA-C					
H1704		HLA-A														HLA-C				HLA-C			
Lab #	Lot #	4	6	25	26	27	28	29	33	34	60	77	82	88	90	93	96	A*0216	B*5101	B*5102	Cw*0704	Cw*15	
D-011	005	6	6	6	6	6	4	1	1	6	6	6	1	4	4	4	2	51	-	7	15	Cw*15	
D-040	005	6	6	8	6	6	4	1	1	8	6	6	1	4	4	4	A*02	B*51	-	Cw*0704	Cw*15		
D-041	005	8	8	8	8	8	8	1	1	8	8	8	1	8	8	8	8	5101/02/034+	nd	0704/11/12	1502/07/08		
D-048	005	8	8	8	8	8	8	6	1	1	8	8	6	1	8	8	8	A*0201/02/034+	B*5101/02/034+	Cw*0704/11/12	Cw*1502/07/08		
D-056	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	A*0201/02/034+	B*5101/02/034+	Cw*0704/11/12	Cw*1502/07/08		
D-065	005	8	8	8	8	8	8	6	1	1	8	8	1	8	8	8	8	A*0201/02/034+	B*5101/02/034+	Cw*0704/11/12	Cw*1502/07/08		

Recommended notations: A\*0201/02/034+

Recommended notations: A\*0201/02/034+

**图 2 Micro SSP Generic HLA Class I DNA Typing Tray (Micro SSP 1L)**

Micro SSP Generic HLA Class II DNA Typing Tray (Micro SSP 2L)

H1701	Reactions										Local determinations				HLA-DQB1	
	Lab #	Lot #	4	15	22	23	25	26	27	HLA-DRB1	Unknown	DRB3/4/5	Unknown	DQB1	DQB1	
D-065	004	E1 B2	C3	B3	H4	G4	F4	unknown	DRB1*1402/05/06/+	DRB1*1501/02/03/+	DRB3/01/02/03	DRB5'01/02	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+		
D-017	005	8	8	8	8	8	8	8	*1402/05/06/+	*1501/02/03/+	B3*01/02/03	B5*01/02	*0501/02/03/+	*0601/02/03/+		
D-041	05A	8	8	8	8	8	8	8	1402/05/06/+	1501/02/03/+	DRB3*01/01/02/03/+	DRB5*01/01/02/03/+	0501/02/03/+	0601/02/03/+		
D-048	05A	8	8	8	8	8	8	8	DRB1*1402/05/06/+	DRB1*1501/02/03/+	DRB3*01/01/02/03/+	DRB5*01/01/02/03/+	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+		
D-056	05A	8	8	8	8	8	8	8	1402/15/06/+	1501/02/03/+	DRB3*01/02/03	DRB5*01/01/02/03/+	0501/02/03/+	0601/02/03/+		
Recommended notation		DRB1*1402/05/06/+										DRB3*01/02/03/+	DRB5*01/01/02/03/+	DQB1*0501/02/03/+	DQB1*0601/02/03/+	
												DRB3*01/01/02/03/+	DRB5*01/01/02/03/+	DRB3*01/01/02/03/+	DRB5*01/01/02/03/+	

H1702		Reactions				Local determinations				
Lab #	Lot #	4	21	22	26	HLA-DRB1		DRB3/4/5		HLA-DQB1
D-065	004	8	8	8	8	DRB1*1001	DRB5*01/02	DRB5*01/02	DRB1*0501/02/03/+	-
D-017	005	8	8	8	8	*1001	*1501/02/03/+	B5*01/02	-	*0501/02/03/+
D-041	05A	8	8	8	8	1001	1501/02/03/+	DRB5*01/01/02/03/+	-	0501/02/03/+
D-048	05A	8	8	8	8	DRB1*1001/0102	DRB1*1501/02/03/+	-	-	DRB1*0501/02/03/+
D-056	05A	8	8	8	8	1001	1501/02/03/+	DR5*01/01/02/03/+	-	0501/02/03/+
Recommended notation		DRB1*1001		DRB5*01/02/03/+		DRB5*01/01/02/03/+		DRB5*01/02/03/+		DRB5*01/02/03/+
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02
										DRB5*01/02

H1703				Reactions		Local determinations			
Lab #	Lot #	D1	C3	D4		HLA-DRB1	DRB3/4/5		HLA-DQB1
D-065	004	8	8	8	DRB1*1602 DRB1*1601/02/03/4	unknown	DRB5*01/02	-	DOB1*0301/04/09/+
D-017	005	8	8	8	*1601/02/03/+	B5*01/02	-	*0301/04/09/+	-
D-041	05A	8	8	8	1601/02/03/+	DRB5*01/01/02/03/+	-	0301/04/09/+	-
D-048	05A	8	8	8	DRB1*1601/02/03/4	-	DRB5*01/01/02/03/+	-	DOB1*0301/04/09/+
D-056	05A	8	8	8	1601/07/08	-	DRB5*01/01/02/03/+	-	0301/04/09/+
Recommended notation DRB1*1601/02/03/+					DRB5*01/01/02/02/+	-	DRB5*01/01/02/02/+	-	DOB1*0301/04/09/+

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

**Micro SSP HLA Class I and II ABDR DNA Typing Tray**

Reactions														Local Determinations				Local Determinations				DRB3/4/5			
H1701		Lab #	Lot #	7	8	14	28	39	43	45	52	55	57	73	76	87	93	94	96	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	HLA-DRB1	Local Determinations	DRB3/4/5
		B1	A1	C2	E4	B5	F6	D6	E7	B7	H8	H10	E10	B11	D12	C12	A12	A11	A*101	A*2403	B*1502	B*5502	unknown	unknown	
D-059	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	B*15	B*55	DRB1*14	DRB1*15	DRB3	DRB5	
D-061	005	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1101/02/03/+	1402/03/05/+	1501/02/03/+	1501/02/03/+	3'0101/02/03/+	5'0101/02/03/+	
D-066	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	1101/02/03/+	1402/03/04/+	1502	5502/07/12/+	1402/03/05/+	1501/02/03/+	
																			B*5502/07/12	B*1502	DRB1*1402/03/04/+	DRB1*1501/02/03/+	DRB3/01/02/03	DRB5/01/02	
																							DRB3/01/02/01/+	DRB5/01/02/01/+	
H1702		Lab #	Lot #	4	15	30	31	39	40	41	46	56	69	73	76	92	93	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	HLA-DRB1	Local Determinations	DRB3/4/5		
		E1	B2	C4	B4	B5	A5	H6	C6	A7	D8	H10	E10	E12	D12		A*1023	B*7075	B*1519	unknown	unknown	DRB5	-	-	-
D-059	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	B*02	B*07	B*15	DRB1*10	DRB1*15	DRB5	-	-	-
D-061	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	0705/06	1512/14/19	1001	1501/02/03/+	5'0101/02/03/+	-	-	-
D-066	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0201/02/03/+	280/102/03/+	1512/14/19	1001	1501/02/03/+	DRB5/01/02	DRB3/01/02/03/+	DRB5/01/02	DRB5/01/02/02/+
H1703		Lab #	Lot #	4	25	26	27	28	56	72	77	93						HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	HLA-DRB1	Local Determinations	DRB3/4/5		
		E1	H4	F4	E4	A7	A9	D10	D12								A*0204	B*5101	DRB1*1602	DRB1*1602	DRB5	-			
D-059	005	8	8	8	8	8	8	8	8							A*02	B*51	DRB1*16	-	-	DRB5	-	-	-	
D-061	005	8	8	6	6	6	8	8	8							0201/02/03/+	-	1601/02/03/+	-	1601/02/03/+	5'0101/02/03/+	-	-	-	
D-066	005	8	8	8	8	8	8	8	8							0201/02/03/+	-	1601/02/03/+	-	1601/02/03/+	DRB5/01/02	DRB5/01/02	DRB5/01/02	DRB5/01/02/02/+	
H1704		Lab #	Lot #	4	5	24	25	26	27	28	56	72	82	84	94			HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	HLA-DRB1	Local Determinations	DRB3/4/5		
		E1	D1	A3	H4	G4	F4	E4	A7	A9	G11	F11	E11	C12			A*0216	B*5101	DRB1*1104	DRB1*1104	DRB3	-			
D-059	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		A*02	B*51	DRB1*11	DRB1*11	DRB3	-	-	-	-	
D-061	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		0201/02/03/+	0301/03/04/+	5'0101/04/06/+	1201/04/06/+	3'0101/02/03/+	-	-	-	-	
D-066	005	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		0201/02/03/+	0301/03/04/+	5'0101/03/07/+	1201/04/06/+	DRB3/01/02/03/+	DRB1*1201/02/03/+	DRB3/01/02/03/+	DRB3/01/02/03/+	DRB3/01/02/03/+	

**图 4 Micro SSP HLA Class I and Class II ABDR DNA Typing Tray (Micro SSP ABDR)**

同定も全く問題点が見られなかった。このキットについては昨年度も反応性に問題点がみられていない。

## 6. 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、正しいタイプが同定できているようであった。しかしながら、いくつかの施設で

多くの偽反応を示しており、それらの施設においてはさらなる技術的向上が求められる。アリルの判定については昨年よりも向上が見られたが、「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)」がまだ理解されていない施設がみかけられた。今後、アリルの表記法が完全に理解され、正しく記載されることを期待する。

# 第 9 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)—

木村彰方<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>10)</sup>, 太田正穂<sup>3)</sup>, 柏瀬貢一<sup>4)</sup>, 小林 賢<sup>5)</sup>, 酒巻建夫<sup>6)</sup>, 佐田正晴<sup>7)</sup>, 田中秀則<sup>4)</sup>, 中島文明<sup>8)</sup>, 成瀬妙子<sup>9)</sup>, 丸屋悦子<sup>10)</sup>, 安波道郎<sup>1,2)</sup>  
(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. 参加施設

SSO 法を使用した施設は 49 施設あり全参加 65 施設の 75.4% であった。昨年は 51 施設で 70.8% であったので 2 施設減少しているが他の方法と比較すると相対的には増加している。

## 2. SSO キットの使用状況

個々の使用 SSO 法キットについては重複使用を含めダイナルリライが 24 施設で 49%, 湧永 MPH が 9 施設で 18.4%, ルミネックスビーズ法が 18 施設で 36.7%, INNO-LIPA が 2 施設で 4.1% あった。この 1 年でリライと MPH キット使用が減少しルミネックスビーズ法の使用が増加している。ルミネックスビーズ法については別途丸屋が解析し、報告する。

単独使用について見るとリライ単独が 21 施設 18/24 (75%), 全 65 施設中では 27%, MPH 単独使用が 3 施設で 3/9 (33.3%), 全体のなかで 4.6%, ルミネックス法が 11 施設で 11/18 (61.1%), 全体のなか

では 16.9% であった。参考として SSP 法単独使用は 11 施設で 11/27 (40.7%), 全体のなかで 16.9%, SBT 法は 3 施設で 3/8 (37.5%), 全施設中で 4.6% であった。以上のことからリライやルミネックス法はその方法のみで結果が出せる方法として採用されていることを示している。

報告書のスペースの関係上並び替えた生データ表は参加施設に CD-R で配布しているので記載を省略した。

## 3. ダイナルリライキットの分析

リライキットを使用した施設は D-001, 003, 005, 006, 010, 013, 014, 016, 017, 018, 020, 021, 022, 026, 030, 033, 034, 036, 039, 042, 045, 049, 053, 054 の 24 施設(アンダーラインは単独使用施設)であった。

HLA-A 座については、24 施設すべてが解答を寄

せた。キット仕様ごとの施設数では 35 プローブキット使用施設が 3, 40 プローブキット使用施設が 5, 41 プローブキット使用施設が 2, 最新の 43 プローブキット使用施設が 14 であった。新しいキットではプローブが追加されるので、最新の 43 プローブに個々の 35 プローブと 40 プローブがどのように対応するかを表 1 に示した。同様に表 2 には B 座、表 3 には DRB の新旧プローブ対応表を示した。分析のために生データも 43 プローブに対応するように並び替えた。生データ表で np と表示したものは古いキットでは最新版のプローブに対応していないことを示している。生データスコアやアリルの表示などで問題がある場合にはセルに色付けをした。同様に B 座、DR 座キットについても並び替えを行った。

A 座では全般的に良好な反応を示し、タイピングも 2 桁レベルで一致を認められた。しかしながら 1 報告に不一致が認められた。H1705 検体で A2 ブランクの例であったがこの D-030 施設の報告では A24 と反応する複数のプローブと反応がみられた。H1705 と H1706 の検体は今回フィルターに細胞を貼付した形で配布し、各ラボがフィルターを切断後抽出するという作業が必要であった。H1706 の検体が A24 ブランクの検体であることを考えると H1705 の検体に謝って H1706 の検体が混入した可能性(フィルターが 2 枚入ってしまった?)や日本人での A24 ブランクの頻度が高いことを考慮すると外部から何らかの過程でこのような検体の混入したこととも考えられる。

H1706 検体の生データ報告でタイピング結果記入の特異性から見て D-014 施設ではプローブ #1 と #3 を間違えて記入した可能性が高い。

プローブ自体に問題があると思われる例として H1703 の検体で示された。表 4 に示すように A\*0204 か A\*0201 かの判定が #23 プローブの判定により区別される(陽性の場合は 0201)が、スコアー 1 とした施設が 17, スコアー 2 とした施設が 3, スコアー 4 とした施設が 2, スコアー 6 とした施設が 2 であった。一方、H1705 の検体は A\*0201 であるが #23 の判定はすべて陽性(スコアー 4 が 1 施設、スコアー 6 としたのが 1 施設、他はスコアー 8 であった。本キットには対立遺伝子である A\*0204 アリル

表 1 ダイナルリライ、プローブ対応表 HLA-A

43プローブキット	40プローブキット	35プローブキット
1	1	—
2	2	1
3	3	2
4	4	3
5	5	4
6	6	5
7	7	6
8	8	7
9	9	8
10	10	9
11	11	10
12	12	11
13	13	12
14	14	13
15	15	14
16	16	15
17	17	16
18	18	—
19PC	19PC	17PC
20	20	—
21	21	18
22	22	19
23	23	20
24	24	21
25	25	22
26	26	23
27	27	24
28	28	25
29	29	26
30	30	27
31	31	28
32	32	29
33	33	—
34	34	30
35	35	31
36	36	32
37	37	33
38	38	—
39	39	34
40	—	—
41	—	—
42PC	40PC	35PC
43AC	—	—

に対応するプローブの設定はされていない。以上のことから #23 のプローブは他のプローブに比較し偽陽性が出やすいプローブであることが判明し、判定時に注意が必要である。#23 プローブの改良が望まれる。

HLA-B 座については、B 座用のキットとしてはとんどの施設が 62 プローブキットを使用していたが、一部の施設では 56 プローブキットを使用してい

表2 ダイナルリライ、プローブ対応表 HLA-B

62プローブキット	61プローブキット	56プローブキット
1	1	1
2	2	2
3	3	3
4	4	4
5	5	5
6	6	6
7	7	7
8	8	8
9	9	9
10	10	10
11	11	11
12	12	—
13	13	—
14	14	12
15	15	13
16	16	14
17	17	15
18	18	16
19	19	17
20	20	18
21	21	19
22	22	20
23	23	21
24	24	22
25	25	23
26	26	24
27	27	25
28	28	26
29PC	29PC	27PC
30	30	28
31	31	29
32	32	30
33	33	31
34	34	32
35	35	33
36	36	34
37	37	35
38	38	36
39	39	37
40	40	38
41	41	39
42	42	40
43	43	41
44	44	42
45	45	43
46	46	44
47	47	45
48	48	46
49	49	47
50	50	48
51	51	49
52	52	50
53	53	—
54	54	51
55	55	—
56	56	—
57	57	52
58	58	53
59	59	54
60	60	55
61PC	61PC	56PC
62AC	—	—

た。偽陽性や偽陰性の反応が少なくおおむね良好な結果を示した。H1702 の検体の結果では生データスコアが他の施設と同じであるにもかかわらず、D-020 の施設では B\*1512/19 ではなく B\*1501 との判定であった。読み替えでは前者が B76 であるのにに対して B62 となってしまうので明らかなアサインミスと考えられた。

反応パターン表(マップ), 使用するキット, 解析プログラムの新旧によってもアリル表示が異なっている。たとえば H1701 の検体では B\*1502 か B\*1502/88 と記載されるかは使用したマップやプログラムによって異なる結果となる。現在も新しいアリルが発見されて登録数が増加しているが, 新しいタイプになるということは可能性としてゼロではないとしてもきわめて頻度が低い。アリルまで記載するとなると, 実際に HLA タイプの 2 桁レベルを目標としているタイピング現場としては大きな混乱を招く結果となる。

HLA-C 座については, D-003, 018, 022, 034 の 4 施設が参加した。キットはポジティブコントロールを含め 37 プローブで判定するようになっている。生データでは偽陽性と偽陰性が 1 つずつ認められた。アリルの結果はほぼ一致していた。D-018 ラボでは H1703 検体について, ホモザイゴットと考えられる検体に対して, Cw15 アリル 2 つに分割して報告しているが, これだけのデータでは分けられないと考えられる。

HLA-DRB 座については m プローブ数 36 のキットから 54 のキットまで多彩な使用状況になっていた。最新のキットではジェネリックな増幅プライマーに加えて DRB1\*3/11/13/14 のみが増幅されるプライマーが添付されており, 2 施設 (D-045, 049) がこれを利用した。

DRB1 のアリル報告はしていても DRB3-5 遺伝子の報告が空白や 2 桁レベルの報告しかなされてなかつた。

H1701 の検体について DRB1\*1501 と 1405, DRB3 と DRB5 の 4 遺伝子がジェネリックなプライマーで増幅されるために, 最新のアリルデータ

表3 ダイナルリライ, プローブ対応表 HLA-DRB

54プローブキット	45プローブキット
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10
11	11
12	12
13	13
14	14
15	15
16	16
17	17
18	18
19	19
20	20
21	21
22	22
23	23
24	24
25	25
26	26
27	27
28	28
29	29
30	30
31	31
32	32
33	33
34	34
35	35
36	36
37	37
38	-
39	-
40	-
41	-
42	-
43	-
44	-
45	-
46	39
47	40
48	42
49	43
50	38
51	41
52	44
53PC	45PC
54AC	-

ベースを盛り込んだ解析ソフトでは2桁レベルの特異性も決めることができない。たとえば DR11 と DR15 または DR14 と DR15 としてアリルの組み合わせを列挙していく。プローブ数36までのキットでは DR15, 16 の区別も行われない。このようなときに DRB3 遺伝子増幅がなく DRB1\*3/11/13/14 のみが増幅されるプライマーで PCR 増幅をかけると明瞭な結果が得られる。

H1702 検体では DRB1\*1001 と DRB1\*1502 が出題されたが、おおむね正解であったが DRB1\*-1502 が含まれないような回答を寄せたところが1施設認められた。

H1703 では DRB1\*1602, - の出題であった。D-021 の施設は DRB1\*0901 もあると解答したが、#7 プローブ発色も弱く DRB4 遺伝子の反応 (#21 プローブ陽性) が認められないことから無理があると考えられる。#7 プローブ以外にも 2 つの偽陽性が認められているので判定や技術的な問題を再度点検する必要があろう。

H1704 の検体は DRB1\*1201 と DRB1\*1104 の特異性であったが、ジェネリックな増幅のみでは DR12 と DR3, または DR12 と DR11, あるいは DR12 と DR14 などの組み合わせがあり、判定が困難な検体であった。これも DRB1\*03/11/13/14 のみが増幅されるプライマーで PCR 増幅をかけることにより問題は解決される。

H1705 の検体は DRB1\*1201, - の検体であったがアリルのアサインでは DRB1\*1201 に加えていくつかの施設では DR8 や DR4 を加えたところがあった。DR4 については DRB4 遺伝子が増幅されていないことから可能性がきわめて低いが DR8 をとるかについては、もし探るとすると DRB1\*0825 という稀なタイプがアサインされることになる。A 座 B 座ともホモザイゴウトと考えられるので、DRB1 についてもブランクの部分に稀な型を考えるよりブランクとした方がよいと考えられる。

H1706 の検体については日本人に見られる典型的な DR1 を示すハプロタイプであり、ホモザイゴウトであるので A, B, DR とも 1 アリルが検出される。1 施設を除いて生データは完全に一致しているが、アリルの表記ではバラツキが認められた。DR4 の可能

性は DRB4 遺伝子が増幅されていないことを考慮すると否定される。A, B, DR のハプロタイプを見ると DRB1\*0101 がもっとも考えられるが、可能性としては 0105 などの可能性も完全には否定できない。

HLA-DQB1 については、D-003, 018, 022, 034 の 4 施設が参加した。DQB は日本人に通常認められる DRB1 との連鎖が異なるものが含まれていたが正しく判定されていた。D-018 の施設では生データの記載ミスがあると思われた。偽陰性と取れる箇所もあった。

リライキットのまとめとして、以下のことが示された。

- 1) 生データを解析すると概ね各施設間のバラツキも少なく、良好な反応を示していた。
- 2) 一部の施設に限り偽陽性や偽陰性が多く認められ、マニュアルや判定に習熟する必要があると思われた。
- 3) HLA 型(血清型)への読替には問題がないが、最終的なアリルの決定では施設間(判定者)にバラツキが認められた。生データは同じでもアサインされた結果が異なる場合も認められた。
- 4) DRB キットでは新抗原の発見によりジェネリック増幅では DR52 関連抗原が明確に区別されない例もあるため、確定のためには DR3, 11, 13, 14 抗原遺伝子のみを増幅するプライマーの使用が必要である。
- 5) 紙検体に対しても対応ができていた。
- 6) 判定プログラム自体にも問題があり、更新や改良が必要と思われた。

#### 4. ワクナガ MPH-2 キットの分析

MPH-2 キットを使用した施設は D-015, 019, 028, 040, 044, 050, 052, 055, 060 の 9 施設(アンダーラインは単独使用施設)であった。D-019 の施設は生データの報告がされなかった。

昨年と同様に生データの報告形式が OD 値、100 倍 OD 値とあり、スコア化データの添付が 2 施設程度しか行われていないためにプローブの陽性、陰

表 4 H1703 と H1705 検体のダイナルリライ A 座キット #23 プローブの反応性

HLA-A*	93	94	95	96	97	98	プローブ	反応アリル
0201	CAC	ACC	gTC	CAG	AGG	ATG	#23	(*0203,*0216も)
0204	CAC	ACC	gTC	CAG	<u>AtG</u>	ATG	#なし	

H1703検体 (A*0204)	H1705検体 (A*0201)
スコアー1と判定 17 施設	スコアー1と判定 0 施設
スコアー2と判定 3 施設	スコアー2と判定 0 施設
スコアー4と判定 2 施設	スコアー4と判定 1 施設
スコアー6と判定 2 施設	スコアー6と判定 1 施設
スコアー8と判定 0 施設	スコアー8と判定 22 施設

表 5 Dynal Reli プローブ対応

Allele	反応プローブ
A*2402	1,7,11,16,19,25,26,31,36,39,42,43
A*2405	1,7,11,16,19, ,26,31,36,39,42,43
A*2423	1,7,11,16,19,25,26,31,36, ,42,43

#### アサインパターン

2402,-

2402,2405/23

2405,2423

表 6 Dynal Reli プローブ対応

Allele	反応プローブ
B*0702	1,7,13,15,20,28,29,32,39,50,54,56,60,61,62
B*0703	1,7,13,15, ,28,29,32,39,50,54,56,60,61,62
B*0717	1,7,13,15,20,28,29,32, ,50,54,56,60,61,62
B*0733	1,7,13,15,20,28,29,32,39,50,54,56, ,61,62

#### アサインパターン

0702, -

0702,0703/17/33

0703,0717/33

0717,0733

性の判定が不明であった。発色の OD 値が各施設間で大きくばらつき、メーカー側の基準としているカットオフ値では偽陽性や偽陰性が多く認められ単純に判定できない状況であった。すなわち施設によりカットオフ値が異なっているものがある。MPH 法ではまずジェネリックな増幅を行い 24 プローブにより判定し必要があればスペシフィックな増幅を行い別のプローブに当てて判定するという方法が用いら

表7 Dynal Reli プローブ対応

Allele	反応プローブ
DRB1*0101	1,30,38,40,46,48,49,53
DRB1*0104	1,30,38,40,46, , ,53
DRB1*0111	1,30,38,40,46, ,49,53
<b>アサインパターン</b>	
<b>0101, -</b>	
<b>0101,0104/11</b>	

れている。そのためにジェネリックな増幅だけでは二桁レベルの区別がうまく行われていない検体もあった。

A 座では D-015 施設が H1702 検体について A\*2907 として他の施設とは異なる解答を寄せた。

B 座では B15 関連を細分化しないまま報告している施設が多く、B7 や B51 についても同様の傾向が認められた。D-028 の施設は H1703 および H1704 検体のホモザイゴウト検体のアサインができていなかった。

C 座では D-040 の施設では 2 桁レベルのアサインができていなかった。

DR 座では D-028 の施設は H1703 検体の DR16 ホモザイゴウトの検体が DR15 と DR16 のヘテロザイゴウトと報告していた。同施設では H1704 検体で DR11 と DR12 のヘテロザイゴウトの検体が正しくアサインされていなかった。D-015 の施設は

H1705 検体の DR12 のホモザイゴウトを DR15 と DR12 のヘテロザイゴウトのヘテロザイゴウトと判定していた。

DQB1 では D-050 施設のホモザイゴウトの記載方法が徹底されていなかった。

## 5. INNO-LIPA キットの分析

このキットを使用した施設は D-027 と 055 の 2 施設であった。前者は DR のみの使用で後者は他法との併用であった。参加施設が少ないために生データ分析の対象からは除外した。本キットのプローブ数はリライと同様に多く、結果報告の精度も同等であった。

## 6. SSO キットにおけるホモザイゴウトタイピングの問題点

SSO キットではすべてのアリルに対応するようにプローブがセットされているわけではないのでプローブとの反応が空欄となる場合が存在する。リライキットを例に取ると表 5-7 に示すように今回の H1706 の検体では A 座、B 座、DR 座の反応パターンからホモザイゴウトの可能性のほか、ヘテロザイゴウトの組み合わせとして幾通りかが考えられる。細胞株がどの人種由来であるのか示されていないので、学会 QCWS としてはすべての可能性を考慮しなければならないところであるが、実際のタイピングの現場としては人種やハプロタイプの頻度を考慮して可能性の高いタイピングを報告するというのが実用的な方法と考えられる。

# 第9回 HLA-QC ワークショップレポート —生データ解析：いわゆる“Luminex 法”—

木村彰方<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>10)</sup>, 太田正穂<sup>3)</sup>, 柏瀬貢一<sup>4)</sup>, 小林 賢<sup>5)</sup>, 酒巻建夫<sup>6)</sup>,  
佐田正晴<sup>7)</sup>, 田中秀則<sup>4)</sup>, 中島文明<sup>8)</sup>, 成瀬妙子<sup>9)</sup>, 丸屋悦子<sup>10)</sup>, 安波道郎<sup>1,2)</sup>

(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所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. はじめに

Luminex 法は一度に 100 種類のプローブを使用し, 4 衡タイピングを可能にする究極に近い r-SSO 法として期待されている。このような方法での HLA タイピングで最も重要なポイントは次の 2 点と考えられる。

(1) PCR の増幅効率(増幅領域を過不足なく増幅する)

(2) プローブの反応性

現在使用可能な HLA-typing kit は 3 社 (★・◆・▲) あり, これらの kit を用いて提出された QC 生データを用い, 上記 2 点を中心に解析した。

## 2. 使用キットによるグループ化と判定結果の比較

参加施設を使用 kit 別に分類(表 1)し, kit 別の判定結果を表 2-4 に示す。今回配布されたサンプルは日本人に希または今のところ見つかっていないアリルを保有するものが主であった。提出された判定結果から施設間差が最も少なかった kit は◆社製

を使用した施設群の結果であった。▲社製 kit 使用施設群で, sample H1703, H1704 につき, B\*5101 と B\*5103 の分離が不能であるとの判定が大半をしました。日本人の HLA-B 座タイピングについて, B\*5101 と B\*5103 の分離は必須であり, プローブの改良が望まれる。

## 3. 増幅効率の比較

テンプレートが DNA 溶液である sample の代表として H1701 を, フィルター付着細胞である sample の代表として H1706 をもちいた。Locus 別・施設別に, 各 kit の陽性コントロール probe の蛍光値を比較し, 各 kit のプライマーによる増幅効率を推測する目安とした (Fig. 1-8)。

### 3.1 HLA-class I 陽性コントロールについて

★および▲ kit は exon 2 に 1 つの陽性 probe と exon 3 に 1 つの陽性 probe が設定されている。◆ kit は exon 2 に 2 つの陽性 probe (増幅された sense 側の配列と反応する probe と anti-sense 側の配列と反

表 1 参加施設 Lab Code

KIT name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	計
▲	○	○	○	○	○	○	○	○	○									○*	10
★							○	○	○	○	○	○	○	○	○				8
◆							○	○	○	○	○				○	○			7

○\* : 生の蛍光値の判別ができなかったため解析から除外した。

表2 QC Sample 判定結果 (★ Kit)

DNA No	Lab Code	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-C	HLA-C	DRB1	DRB1	DQB1	DQB1
H1701	D002	A*1101/03/04+	A*2403/10/22/+	B*1502	B*5502/12/16	not tested	not tested	DRB1*1405/45	DRB1*1501/06/13	not tested	not tested
	D018	A*1101/03/04+	A*2403/10/22/+	B*1502	B*5502/12/16	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+	DRB1*1405/45	DRB1*1501/06/13	DQB1*0503	DQB1*0601
	D032	A*1101/03/04/+	A*2403/10/22/+	B*1502	B*5502/16	not tested		DRB1*1405/45	DRB1*1501/06/13	DQB1*0503	DQB1*0601
	D037	A*11	A*24	B*1502	B*55	not tested		DRB1*14	DRB1*15	not tested	not tested
	D041	A*1101/02/03/+	A*2403/10/22/+	B*1502	B*5502/12/16	C*0801/08	Cw*1203/06/07/+	DRB1*1405/45	DRB1*1501/06/13	DQB1*0503	DQB1*0601
	D043	A*1101/02/03/+	A*2403/10/22/+	B*1502	B*5502/12/16	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+	DRB1*14	DRB1*15	not tested	not tested
	D044	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*14	DRB1*14	not tested	not tested
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*1405/45	DRB1*1501/06/13	not tested	not tested
H1702	D002	A*0203	A*2901/02/04/+	B*705/06	B*1512/19	not tested		DRB1*1001	DRB1*1502/08/14	not tested	not tested
	D018	A*0203	A*2901/01N/02/+	B*705/06	B*1512/19	Cw*0403	Cw*1505/06/09	DRB1*1001	DRB1*1502/08/14	DQB1*0501	-
	D032	A*0203	A*2901/01N/02/+	B*705/06	B*1512/19	not tested		DRB1*1001	DRB1*1502/08/14	DQB1*0501	DQB1*0502
	D037	A*02	A*29	B*07	B*1512/19	not tested		DRB1*10	DRB1*15	not tested	not tested
	D041	A*0203	A*2901/01N/02/+	B*705/06	B*1512/19	Cw*0403	Cw*1505/06/09	DRB1*1001	DRB1*1502/08/14	DQB1*0501	DQB1*0502
	D043	A*0203	A*2901/01N/02/+	B*705/06	B*1512/19	Cw*0403	Cw*1505/06/09	DRB1*1001	DRB1*15	not tested	not tested
	D044	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*1001	DRB1*15	not tested	not tested
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*1001	DRB1*1502/08/14	not tested	not tested
H1703	D002	A*0204/17	-	B*5101/11N/12/+	-	not tested	not tested	DRB1*1602/03/05	-	not tested	not tested
	D018	A*0204/17	-	B*5101/11N/12/+	-	Cw*1502/05/06/+	Cw*1502/03/05/+	DRB1*1602	DRB1*1602/03/05	DQB1*0301/09/13	-
	D032	A*0204/33/58	-	B*5101/11N/12/+	-	not tested	not tested	DRB1*1602/03/05	-	DQB1*0301/09/13	-
	D037	A*02	-	B*51	-	not tested	not tested	DRB1*16	-	not tested	not tested
	D041	A*0201/04/17/+	-	B*5101/03/04/+	-	Cw*1502/03/05/+	-	DRB1*1602/03/05	-	DQB1*0301/09/13	-
	D043	A*0201/04/17/+	-	B*5101/03/04/+	-	B*5101/03/04/+	Cw*1502/03/05/+	DRB1*1602	-	not tested	not tested
	D044	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*1602	-	not tested	not tested
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*1602	DRB1*1602/03/05	not tested	not tested
H1704	D002	A*0216	A*0301/01N/04/+	B*5101/11N/12/+	-	not tested	not tested	DRB1*1104/06/18/+	-	not tested	not tested
	D018	A*0216	A*0301/01N/04/+	B*5101/11N/12/+	-	Cw*0704/11	Cw*1502	DRB1*1104/06/18/+	DRB1*1201/02/03/+	DQB1*0301/09/13	-
	D032	A*0216	A*0301/03N/04/+	B*5101/11N/12/+	-	not tested		DRB1*1104/06/18/+	DRB1*1201/02/03/+	DQB1*0301/09/13	-
	D037	A*02	A*03	B*51	-	not tested	not tested	DRB1*11	DRB1*12	not tested	not tested
	D041	A*0216	A*0301/01N/04/+	B*5101/03/04/+	-	Cw*0704/11	Cw*1502	DRB1*1104/06/18/+	DRB1*1201/02/03/+	DQB1*0301/09/13	-
	D043	A*0216	A*0301/01N/04/+	B*5101/03/04/+	-	Cw*0704/11	Cw*1502	DRB1*11	DRB1*12	not tested	not tested
	D044	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*11	DRB1*12	not tested	not tested
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*1104/06/18/+	DRB1*1201/02/03	not tested	not tested
H1705	D002	A*0201/04/09/+	-	B*1801/02/03/+	-	not tested	not tested	DRB1*1201/06/07/+	-	not tested	not tested
	D018	not assigned	-	B*1801/03/05/+	B*1801/02/03/+	not assigned	not tested	DRB1*1201/06/07/+	-	not tested	not tested
	D032	A*0201/04/09/+	-	B*1801/03/05/+	-	not tested	not tested	DRB1*1201/06/07/+	-	DQB1*0301/09/13	-
	D037	A*02	-	B*18	-	not tested	not tested	DRB1*12	-	not tested	not tested
	D041	A*0201/01L/04/+	-	B*1801/02/03/+	-	Cw*0701/06/18/+	-	DRB1*1201/06/07/+	-	DQB1*0301/09/13	-
	D043	A*0201/01L/04/+	-	B*1801/02/03/+	-	Cw*0701/06/18/+	-	DRB1*12	-	not tested	not tested
	D044	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*12	-	not tested	not tested
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*1201/06/07/+	DRB1*1201/06/07/+	not tested	not tested
H1706	D002	A*2402/05/09N/+	-	B*0702/03/10/+	-	not tested	not tested	DRB1*0101/05/07/+	-	not tested	not tested
	D018	not assigned	-	B*0702/15/17/+	B*0702/03/10/+	not assigned	not tested	DRB1*0101/05/07/+	-	not tested	not tested
	D032	A*2402/03/05/+	-	B*0702/10/15/+	-	not tested	not tested	DRB1*0101/05/07/+	-	DQB1*0501	-
	D037	A*24	-	B*07	-	not tested	not tested	DRB1*01	-	not tested	not tested
	D041	A*2402/05/09N/+	-	B*0702/10/15/+	-	Cw*0702/05/13/+	-	DRB1*0101/05/07/+	-	DQB1*0501	-
	D043	A*2402/05/09N/+	-	B*0702/10/15/+	-	Cw*0702/05/13/+	-	DRB1*01	-	not tested	not tested
	D044	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*01	-	not tested	not tested
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DRB1*0101/05/07/+	DRB1*0101/05/07/+	not tested	not tested

施設の判定結果が大部分の施設の判定結果と相違する場合、その判定結果を斜体で示した。

判定結果で記載上の誤りのある判定について□で囲った。

応する probe) が設定されている。また型判定に用いる各 probe にも sense 側を認識するものであるか, anti-sense 側を認識するものであるかの表示がなされている。型判定に用いる probe が実際に反応する増幅産物の増幅を確認できるコントロール probe の存在は精度の高い判定をおこなうために有用である。(Figure には便宜上, ★・▲ kit のコントロール probe を sense 側の probe として表記したが実際は不明である)。テンプレートがDNAの場合, 大多数

の施設で陽性コントロール probe の蛍光値は 1,000 以上であり良好な増幅が得られていた。Exon 2 と exon 3 の陽性コントロール probe の蛍光値に大きな偏りがある(片方のコントロールがほとんど反応していない)施設は、使用している PCR 機の温度の確認, PCR 条件設定の確認, ハイブリザイゼーション温度の確認などが必要である。テンプレートが filter である場合, 各陽性コントロールの蛍光値は DNA の場合よりやや低くはあるが, 1,000 以下を示す施設は

表 3 QC Sample 判定結果 (◆ Kit)

DNA No	Lab Code	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-C	DRB1
H1701	D002	A*1101/03/04/+	A*2403/10/22/+	B*1502/88	C*0801/08	not tested
	D032	A*1101/03/04/+	A*2403/10/22/+	B*1502	Cw*0801/08	not tested
	D037	A*11	A*24	B*1502	not tested	DRB1*15
	D044	A*11	A*24	B*15	B*55	not tested
	D050	A*1101/03/04/+	A*2403/10/22/+	B*1502/88	B*55	not tested
	D062	A*1101/03/04/+	*2403/10/22/+	B*1502/88	B*5502/16	not tested
H1702	D063	A*1101/03/05/+	A*2403/22/23/+	B*1502/88	B*5502/16	not tested
	D002	A*0203	A*2901	B*0705 / 4805/+	B*1501/12/14/+	DRB1*1405/43/45
	D032	A*0203	A*2901	B*0705/06	B*1512/19	DRB1*150
	D037	A*29	A*29	B*07	B*15/219	DRB1*10
	D044	A*0203	A*2901	B*07	B*15	DRB1*15
	D050	A*0203	A*2901	B*0705/06/09	B*1501/12/14/+	not tested
H1703	D062	A*0203	A*2901	B*0705/06/09/+	B*1501/12/14/+	not tested
	D063	A*0203	A*2901	B*0705 / 7576/+	B*1501 / 4805/+	not tested
	D002	A*0204/17/58/+	-	B*5101/11/N/12/+	Cw*1502/04/07/+	not tested
	D032	A*0204/33/58	-	B*5102/11/N/12/+	Cw*1502/04/07/+	not tested
	D037	A*02	-	B*51	not tested	DRB1*16
	D044	A*02	-	B*51	-	-
H1704	D050	A*0204/17/58/+	A*0204/17/58/+	B*5101/11/12/+	Cw*1502/04/07/+	not tested
	D062	A*0204/17/58/+	A*0204/17/58/+	B*5101/11/12/+	not tested	not tested
	D063	A*0204/17/58/+	A*0204/17/58/+	B*5101/11/12/+	not tested	not tested
	D002	A*0216	A*301/03/N/04/+	B*5101/11/N/12/+	Cw*1502/04/07/+	DRB1*1508/1601/+
	D032	A*0216	A*301/03/N/04/+	B*51	Cw*1502/04/07/+	DRB1*1508/1601/+
	D037	A*02	A*03	B*51	Cw*1502/04/07/+	DRB1*1508/1601/+
H1705	D044	A*0216	A*301/03/04/+	B*5101/11/12/+	Cw*1502/04/07/+	DRB1*1508/1601/+
	D050	A*0216	A*301/03/04/+	B*5101/11/12/+	Cw*1502/04/07/+	DRB1*1508/1601/+
	D062	A*0216	A*301/03/04/+	B*5101/11/12/+	Cw*1502/04/07/+	DRB1*1508/1601/+
	D063	A*0216	A*301/03/04/+	B*5101/11/12/+	Cw*1502/04/07/+	DRB1*1508/1601/+
	D002	A*0201/04/09/+	-	B*1801/02/03/+	Cw*0701/06/16/+	not tested
	D032	A*0201/04/09/+	-	B*1801/03/05/+	Cw*0701/06/16/+	not tested
H1706	D037	A*02	-	B*18	not tested	DRB1*12
	D044	A*02	-	B*18	not tested	DRB1*11
	D050	A*0201/04/09/+	A*0201/04/09/+	B*1801/02/03/+	Cw*0701/06/16/+	not tested
	D062	A*0201/04/09/+	A*0201/04/09/+	B*1801/02/03/+	not tested	not tested
	D063	A*0201/04/09/+	A*0201/04/09/+	B*1801/02/03/+	not tested	not tested
	D002	A*2402/03/05/+	-	B*0702/09/10/+	Cw*0702/03/05/+	not tested
H1706	D032	A*2402/03/05/+	-	B*07	not tested	DRB1*0101/04/05/+
	D037	A*24	-	B*07	-	-
	D044	A*24	-	B*07	-	not tested
	D050	A*2402/03/05/+	A*2402/03/05/+	B*0702/09/10/+	Cw*0702/03/05/+	not tested
	D062	A*2402/03/05/+	A*2402/03/05/+	B*0702/09/10/+	not tested	not tested
	D063	A*2402/03/05/+	A*2402/03/05/+	B*0702/09/10/+	Cw*0702/03/05/+	not tested

施設の判定結果が大部分の施設の判定結果と重複する場合、その判定結果を斜体で示した。

判定結果で記載上の誤りのある判定について□で囲った。

表4 QC Sample 判定結果 (▲ Kit)

DNA No	Lab Code	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-C	HLA-C	DRB1	DRB1
H1701	D002	A*1101/04/05/+	A*2403/10/33	B*1502	B*5501/02/07	Cw*0801/08	Cw*1203/06/11	DRB1*1405	DRB1*1501/03/06/+
	D007	A*1101/04/05/+	A*2403/10/33	B*1502	B*5501/02/07	Cw*0801/08	Cw*1203/06/11	DRB1*1405	DRB1*1501/03/06/+
	D012	A*1101/05/07/+	A*2403/10/33	B*1502	B*5501/02/07	Cw*0801/08	Cw*1203/06/11	DRB1*1405	DRB1*1501/03/06/+
	D023	A*11	A*24	B*1502	B*55	Cw*08	Cw*12	DRB1*14	DRB1*15
	D025	A*1101/04/05/+	A*2403/10/33	B*1502	B*5501/02/07	not tested	not tested	DRB1*1405	DRB1*1501/03/06/+
	D029	A*1101	A*2403	B*1502	B*5502	Cw*0801	Cw*120301	DRB1*140501	DRB1*150101
	D046	A*1101/04/05/+	A*2403/10/33	B*1502	B*5501/02/07	not tested	not tested	DRB1*1405	DRB1*1501/03/06/+
	D051	A*1101/05/07/+	A*2403/10/33	B*1502	B*5501/02/07	Cw*0801/08	Cw*1203/06/11	DRB1*1405	DRB1*1501/03/06/+
	D057	A*1101/04/05/+	A*2403/10/33	B*1502	B*5501/02/07	Cw*0801/08	Cw*1203/06/11	DRB1*1405	DRB1*1501/03/06/+
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	Cw*0801/08	Cw*1203/06/11	not tested	not tested
H1702	D002	A*0203	A*2901/02/04/+	B*0705/06/09/+	B*1501/12/14/+	Cw*0403	Cw*1505	DRB1*1001	DRB1*1502
	D007	A*0203	A*2901/02/04/+	B*0705/06/09/+	B*1501/12/14/+	Cw*0403	Cw*1505	DRB1*1001	DRB1*1502
	D012	A*0203	A*2901/02/04/+	B*07	B*15	Cw*0403	Cw*1505	DRB1*1001	DRB1*1502
	D023	A*02	A*29	B*07	B*15	Cw*04	Cw*15	DRB1*1001	DRB1*15
	D025	A*0203	A*2901/02/04/+	B*0705/06/09/+	B*1501/12/14/+	not tested	not tested	DRB1*1001	DRB1*1502
	D029	A*0203	A*2901	B*0705	B*150101	Cw*0403	Cw*1505	DRB1*100101	DRB1*150201
	D046	A*0203	A*2901/02/04/+	B*0705/06/09/+	B*1501/12/14/+	not tested	not tested	DRB1*1001	DRB1*1502
	D051	A*0203	A*2901/02/04/+	B*0705/06/09/+	B*1501/12/14/+	Cw*0403	Cw*1505	DRB1*1001	DRB1*1502
	D057	A*0203	A*2901/02/04/+	B*0705/06/09/+	B*1501/12/14/+	Cw*0403	Cw*1505	DRB1*1001	DRB1*1502
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	Cw*0403	Cw*1505	not tested	not tested
H1703	D002	A*0204/17	-	B*5101/09/11N/+	-	Cw*1502/03	-	DRB1*1511/1602	-
	D007	A*0204/17	A*0204/17	B*5101/03/09/+	B*5101/03/09/+	Cw*1502/03	Cw*1502/03	DRB1*1602	DRB1*1511/1602
	D012	A*0204/17	-	B*51	-	Cw*1502/03	-	DRB1*15/16	-
	D023	A*02	-	B*51	-	Cw*15	-	DRB1*1602	-
	D025	A*0204/17	-	B*5101/03/09/+	B*5101/03/09/+	not tested	not tested	DRB1*1601/02/05	-/DRB1*1511
	D029	A*0204	-	B*5101	-	Cw*1502	-	DRB1*160201	-
	D046	A*0204/17	A*0204/17	B*5101/03/09/+	B*5101/03/09/+	not tested	not tested	DRB1*1602	DRB1*1511/1602
	D051	A*0204/17	-	B*5101/03/09/+	-	Cw*1502/03	-	not tested	not tested
	D057	A*0204/17	-	B*5101/09/11N/+	-	Cw*1502/03	-	DRB1*1602	DRB1*1511/1602
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	Cw*1502/03	Cw*1502/03	not tested	not tested
H1704	D002	A*0216	A*0301/03N/04/+	B*5101/09/11N/+	-	Cw*0704/11/12	Cw*1502/03	DRB1*1104/18/41/+	DRB1*1201/02/03/+
	D007	A*0216	A*0301/03N/04/+	B*5101/03/09/+	B*5101/03/09/+	Cw*0704/11/12	Cw*1502/03	DRB1*1104/06/18/+	DRB1*1201/02/03/+
	D012	A*0216	A*0301/03/04/+	B*51	-	Cw*0704/11/12	Cw*1502/03	DRB1*11	DRB1*12
	D023	A*02	A*03	B*51	-	Cw*07	Cw*15	DRB1*11	DRB1*12
	D025	A*0216	A*0301/03/04/+	B*5101/03/09/+	-	not tested	not tested	DRB1*1104/06/18/+	DRB1*1201/02/03/+
	D029	A*0216	A*30101	B*5101	-	Cw*0704	Cw*1502	DRB1*110401	DRB1*1201
	D046	A*0216	A*0301/03N/04/+	B*5101/03/09/+	B*5101/03/09/+	not tested	not tested	DRB1*1104/06/18/+	DRB1*1201/02/03+
	D051	A*0216	A*0301/03/04/+	B*5101/03/09/+	-	Cw*0704/11/12	Cw*1502/03	DRB1*1104/06/18/+	DRB1*1202/03/06/+
	D057	A*0216	A*0301/03N/04/+	B*5101/09/11N/+	-	Cw*0704/11/12	Cw*1502/03	DRB1*1104/06/18/+	DRB1*1201/02/03/+
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	Cw*0704/11/12	Cw*1502/03	not tested	not tested
H1705	D002	A*0201/04/09/+	-	B*1801/02/05/+	-	Cw*0701/06/18/+	-	DRB1*1201/06/08	-
	D007	A*0201/04/09/+	A*0201/04/09/+	B*1801/02/05/+	B*1801/02/05/+	Cw*0701/06/18/+	Cw*0701/06/18/+	DRB1*1201/06/08	DRB1*1201/06/08
	D012	A*02	-	B*18	-	Cw*07	-	DRB1*1201/06/08	-
	D023	A*02	-	B*18	-	Cw*07	-	DRB1*12	-
	D025	A*0201/04/09/+	-	B*1801/02/05/+	-	not tested	not tested	DRB1*1201/06/18/+	-
	D029	A*0201/01	-	B*1801	-	Cw*0701	-	DRB1*1201	-
	D046	A*0201/04/09/+	A*0201/04/09/+	B*1801/02/05/+	B*1801/02/05/+	not tested	not tested	DRB1*1201/06/08	-
	D051	A*0204/17	-	B*1801	-	Cw*0701/06/18/+	-	DRB1*1201/06/08	-
	D057	A*0201/04/09/+	-	B*1801/02/05/+	-	Cw*0701/06/18/+	-	DRB1*1201/06/08	-
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	Cw*0701/06/18/+	Cw*0701/06/18/+	not tested	not tested
H1706	D002	A*2402/05/07/+	-	B*0702/15/21/+	-	Cw*0702/05/08/+	-	DRB1*0101/08	-
	D007	A*2402/05/07/+	A*2402/05/07/+	B*0702/15/21/+	B*0702/15/21/+	Cw*0702/05/08/+	Cw*0702/05/08/+	DRB1*0101/08	DRB1*0101/08
	D012	A*24	-	B*07	-	Cw*07	-	DRB1*0101/08	-
	D023	A*24	-	B*07	-	Cw*07	-	DRB1*01	-
	D025	A*2402/05/07/+	-	B*0702/15/21/+	-	not tested	not tested	DRB1*0101/08	-
	D029	A*2402	-	B*070201	-	Cw*0702	-	DRB1*0101/07	-
	D046	A*2402/05/07/+	A*2402/05/07/+	B*0702/15/21/+	B*0702/15/21/+	not tested	not tested	DRB1*0101/08	-
	D051	not assigned	-	not assigned	-	not assigned	-	DRB1*0101/08	-
	D057	A*2402/05/07/+	-	B*0702/15/21/+	-	Cw*0702/05/08/+	-	DRB1*0101/08	-
	D062	not tested	not tested	not tested	not tested	Cw*0702/02/08/+	Cw*0702/02/08/+	not tested	not tested

施設の判定結果が大部分の施設の判定結果と相違する場合、その判定結果を斜体で示した。

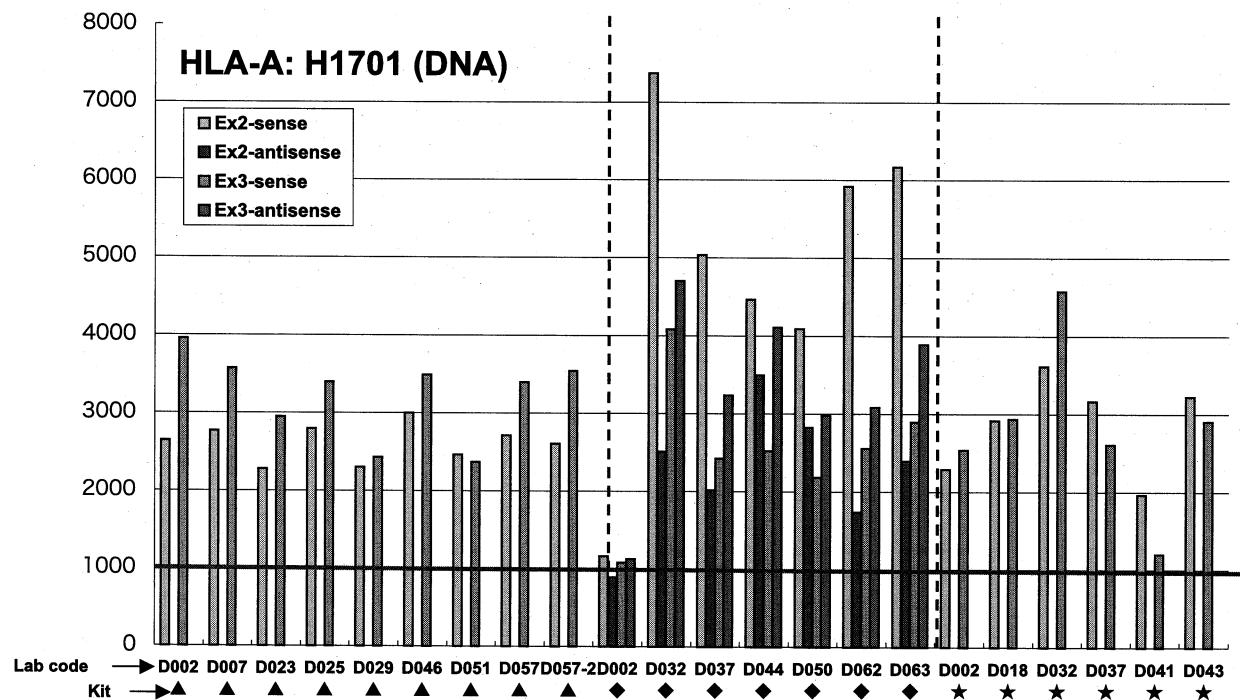


Fig. 1 Comparison of positive control intensity between institutions in HLA-A typing using specimen H1701

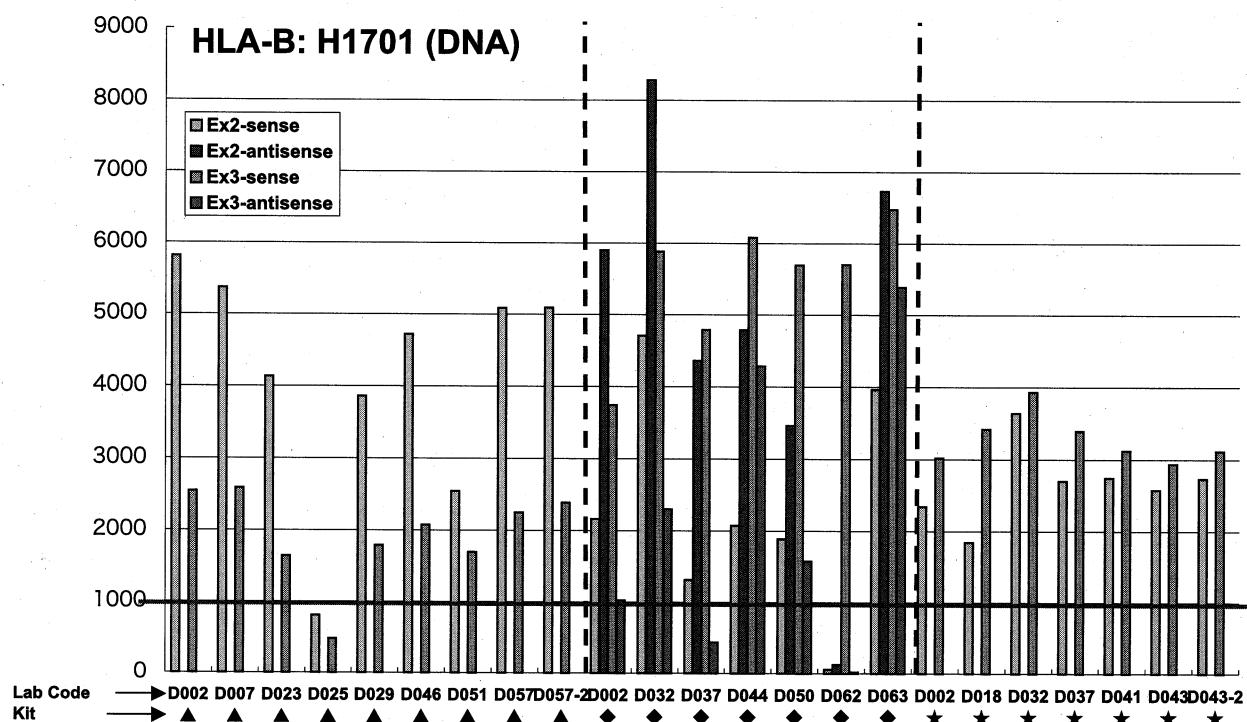


Fig. 2 Comparison of positive control intensity between institutions in HLA-B typing using specimen H1701

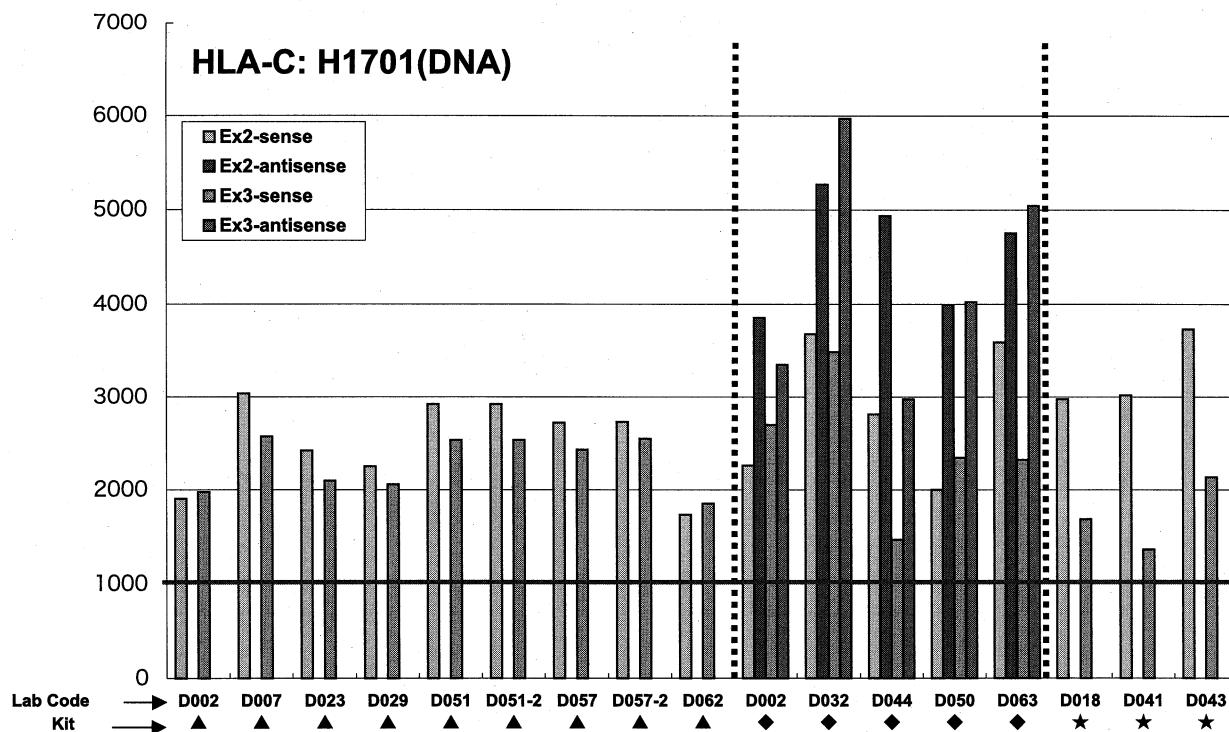


Fig. 3 Comparison of positive control intensity between institutions in HLA-C typing using specimen H1701

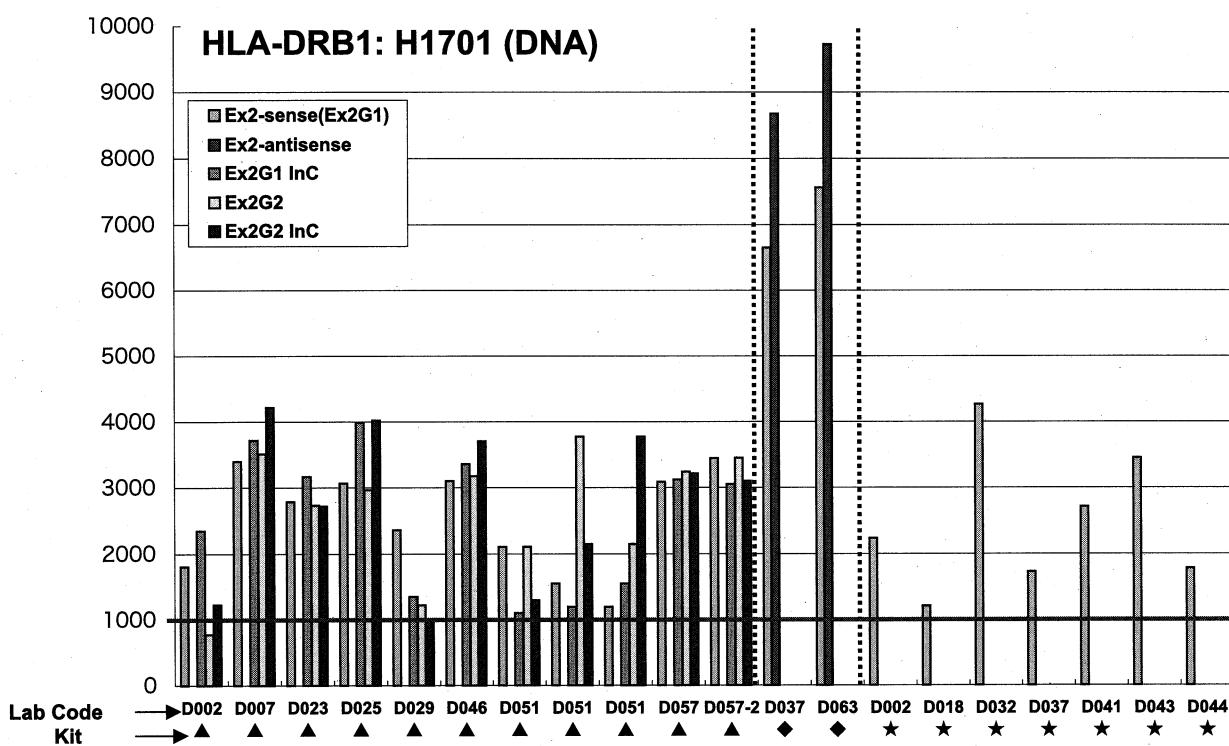


Fig. 4 Comparison of positive control intensity between institutions in HLA-DR typing using specimen H1701

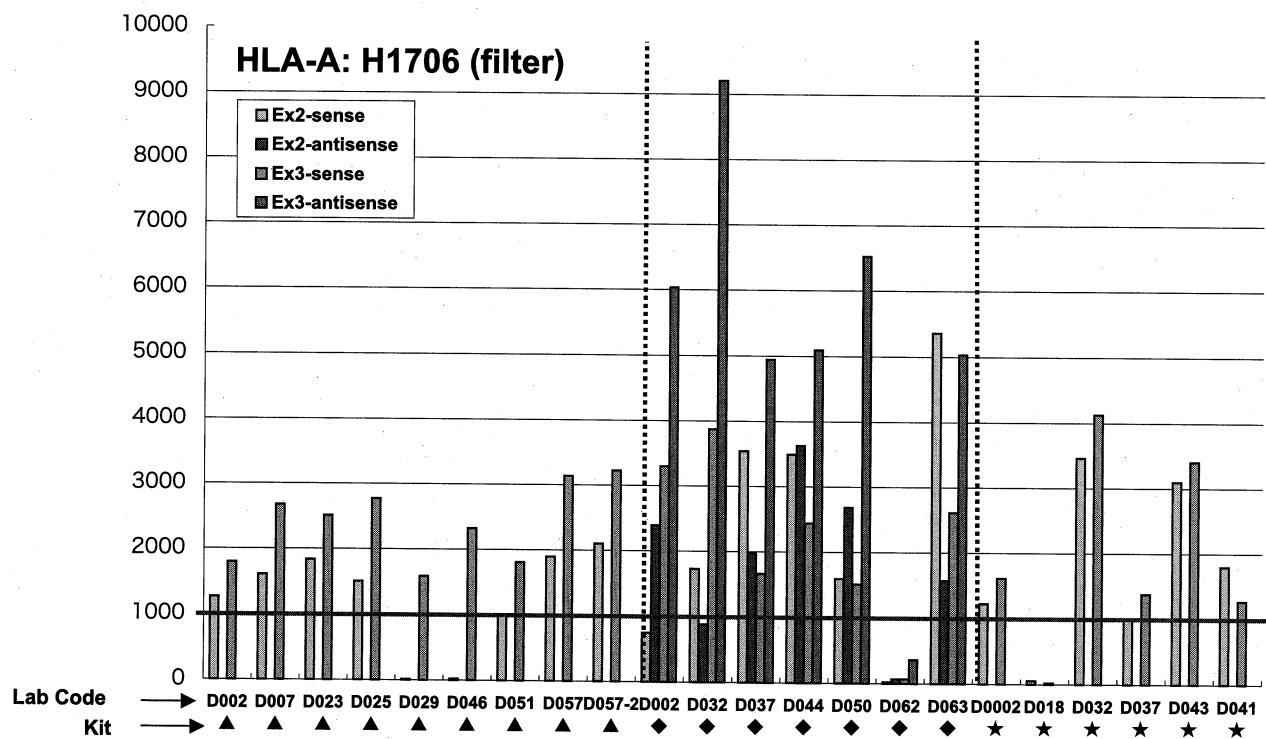


Fig. 5 Comparison of positive control intensity between institutions in HLA-A typing using specimen H1706

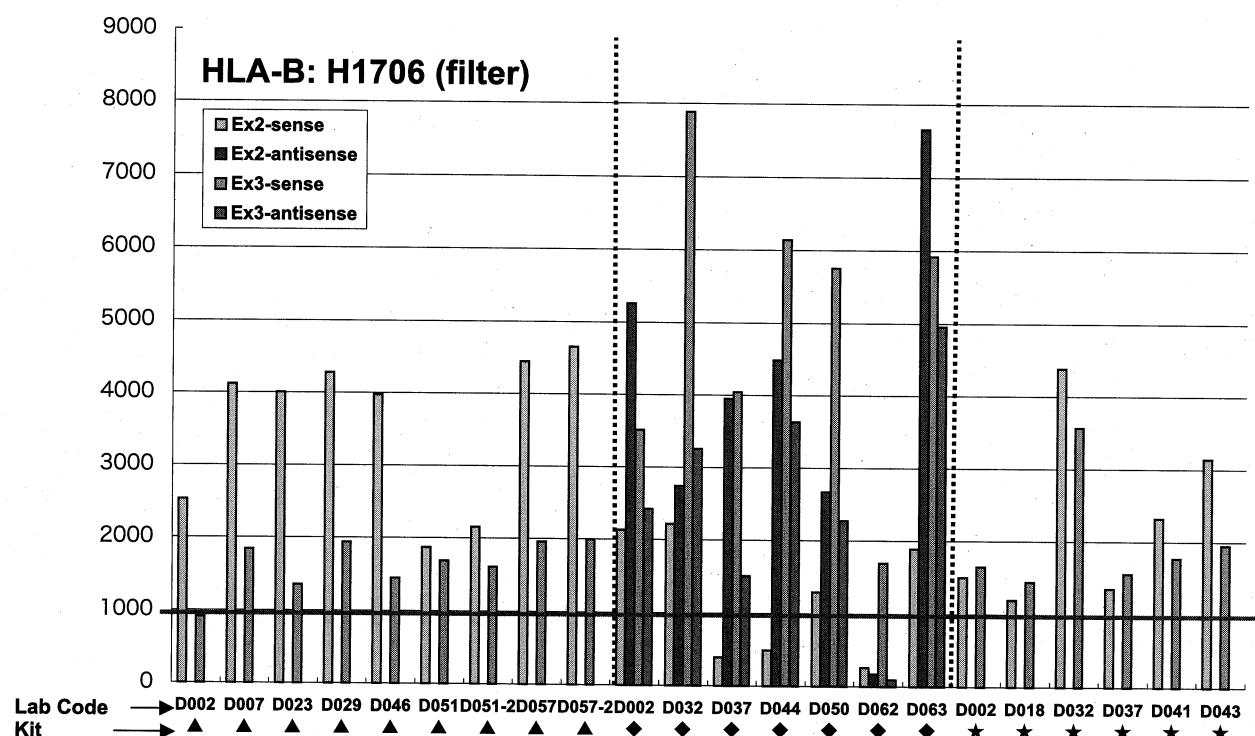


Fig. 6 Comparison of positive control intensity between institutions in HLA-B typing using specimen H1706

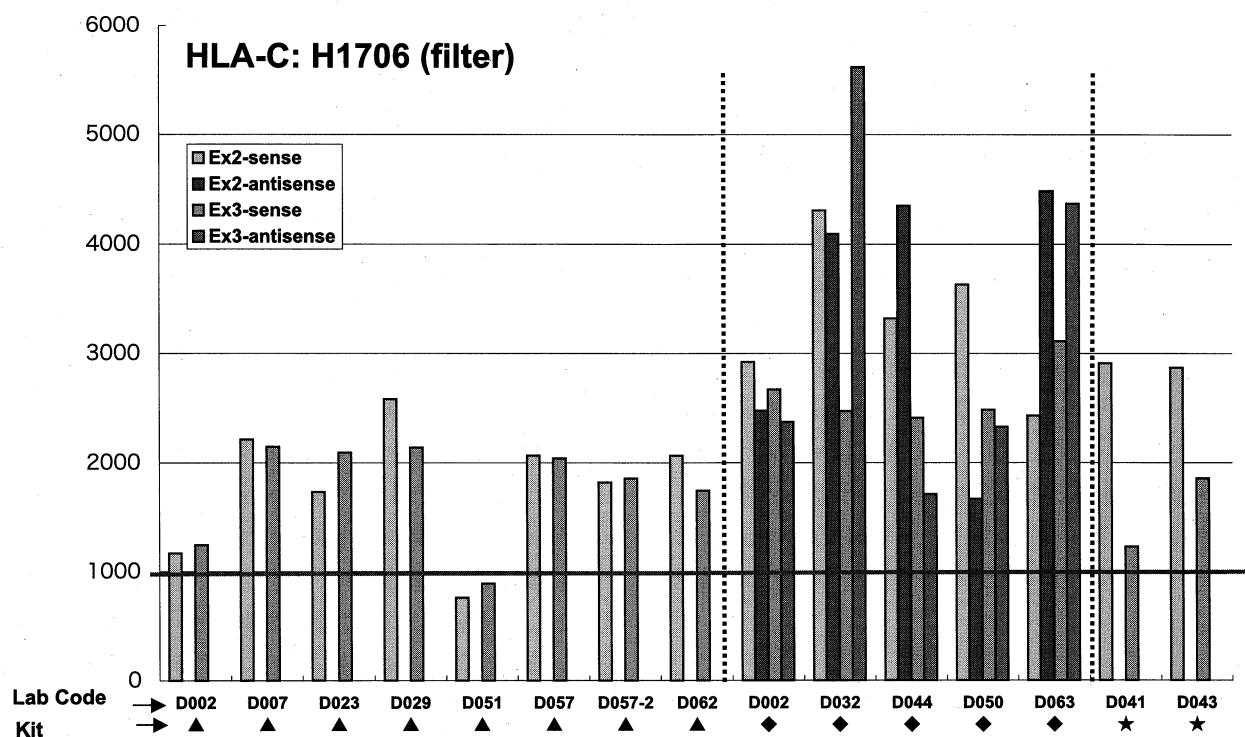


Fig. 7 Comparison of positive control intensity between institutions in HLA-C typing using specimen H1706

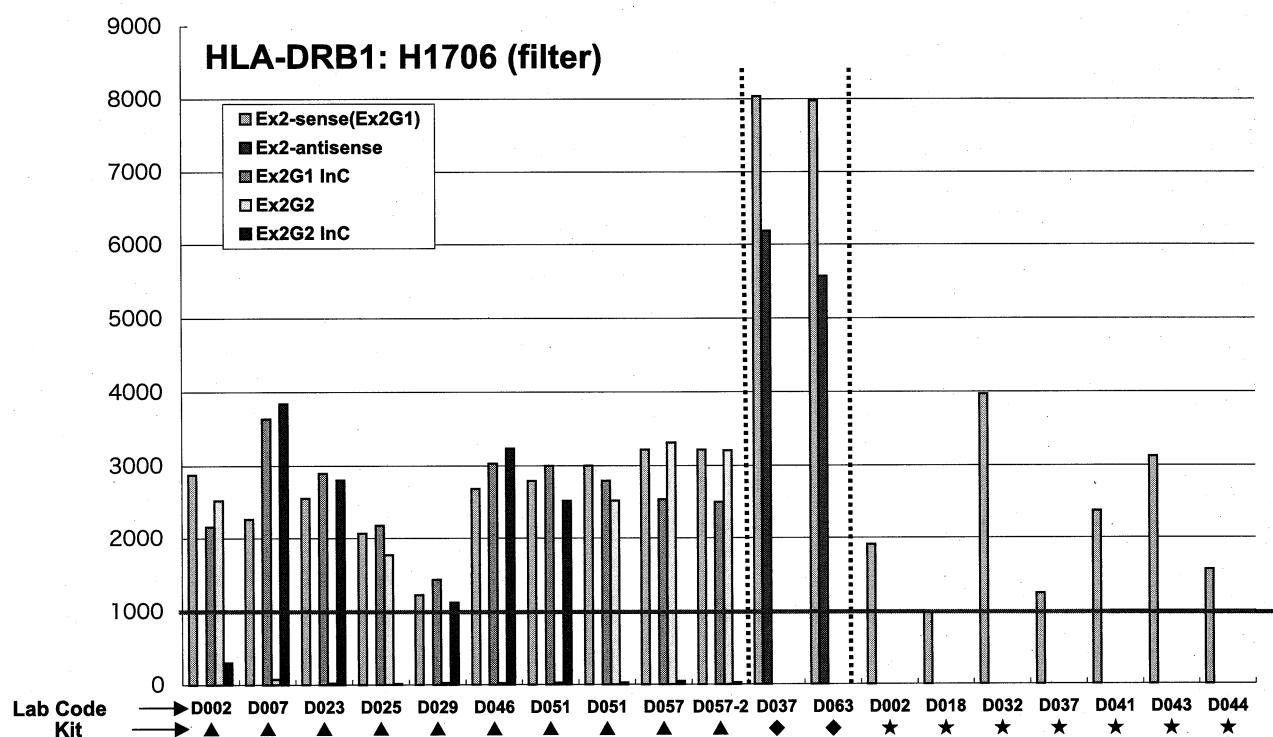


Fig. 8 Comparison of positive control intensity between institutions in HLA-DRB1 typing using specimen H1706

ほとんどなくテンプレートによる増幅効率の違いは見られなかった。

### 3.2 HLA-class II 陽性コントロールについて

▲ kit は group specific な増幅をおこなっているため、exon 2 で 4 つの陽性コントロールが設定されている。◆ kit は exon 2 に sense と antisense の陽性コントロールが設定されている。★ kit は exon 2 に 1 つの陽性コントロールが設定されている。Figure では便宜上 exon 2 の sense 側のコントロールとして記載している。HLA-DRB1 についても HLA-class I と同様、テンプレートの差 (DNA 対 filter) による極端な増幅効率の差はほとんど見られなかった。陽性コントロールについて、すべての sample についてのデータがワークショップデータ CD に記載している。

## 4. タイピング用 probe の評価

多種類の probe を用いるタイピングでは、できる限り多くの probe が同一のハイブリダイゼーション条件で陰性・陽性の区別が明瞭なことが望まれる。Probe ごとに独自の cut off 値が設定されているが、sample ごとに増幅効率・反応性の違いなどにより、cut off 値の変更を余儀なくされる場合もある。Probe の評価方法として、使用する probe が陰性と判定される蛍光値の最大値と陽性と判定される蛍光値の最小値の比 (P/N 比) による評価をおこなった。P/N 比が大きい probe ほど反応性が明瞭な安定した良い probe である。Kit 別、locus 別、施設別に P/N 比を計算し、比較した。さらに Kit 別に全使用施設のデータによる P/N 比をもとめ、総合評価をおこなった。P/N 比の計算式を示す。

$$\text{P/N 比} = \frac{\text{生データの中で陽性と判定されたデータの最小値}}{\text{生データの中で陰性と判定されたデータの最大値}}$$

各 kit に使用されているすべての probe が評価対象となるのではなく、今回の QC sample で陽性反応と陰性反応を示した probe のみが評価対象となる。また kit による lot 差により使用される probe が異なる probe は評価対象から除外した。P/N 比を次の 3 種類に分類した。

P/N = < 1

P/N = 1–5

P/N => 5

1. のカテゴリーに属する probe は、増幅効率の違いや反応性の違いにより、ある sample では陰性と判定される蛍光値が別の sample では、それ以下の値でも陽性と判定される場合がある probe を意味し、判定には要注意を要する probe である。
2. のカテゴリーに属する probe は陰性と判定される蛍光値が陽性と判定される値より常に小さく、陽性 probe は最大陰性値の 5 倍強い蛍光値を示す。
3. のカテゴリーに属する probe は反応性も安定し、判定が容易な優れた probe である。

### 施設別 P/N 比の評価

HLA-class I kit に使用されている probe について、施設ごとに評価した場合、カテゴリー 1 に属する probe はほとんど良好な結果であった。HLA-class II kit では ▲ kit 使用施設の半数にカテゴリー 1 と評価される probe が少数みられた。施設間差による可能性がある (Fig. 9–12)。

### P/N 比の総合評価

HLA-class I と II typing kit を各 kit 別に使用総施設データをもとに P/N 比を解析し比較した結果 (Fig. 13)，カテゴリー 1 の probe を含まない優秀な kit を以下に示す。

A locus kit: ★ kit

B locus kit: ◆ kit

C locus kit: ◆ kit と ▲ kit

DR locus kit: ◆ kit と ▲ kit

DQ locus kit: ★ kit

各カテゴリーの probe が各 kit に含まれるパーセントを Fig. 14 に示す。

## 5. まとめ

Luminex 法を用いる施設の増加に伴い、同一のテンプレートによる多施設の生データを比較検討することが可能となった。自施設と他施設のデータを比較検討し、各施設が独自で検査環境の精度管理がおこなえるばかりでなく、kit メーカーに、より良い kit 作成に向けての改良点の提起をも可能とした。

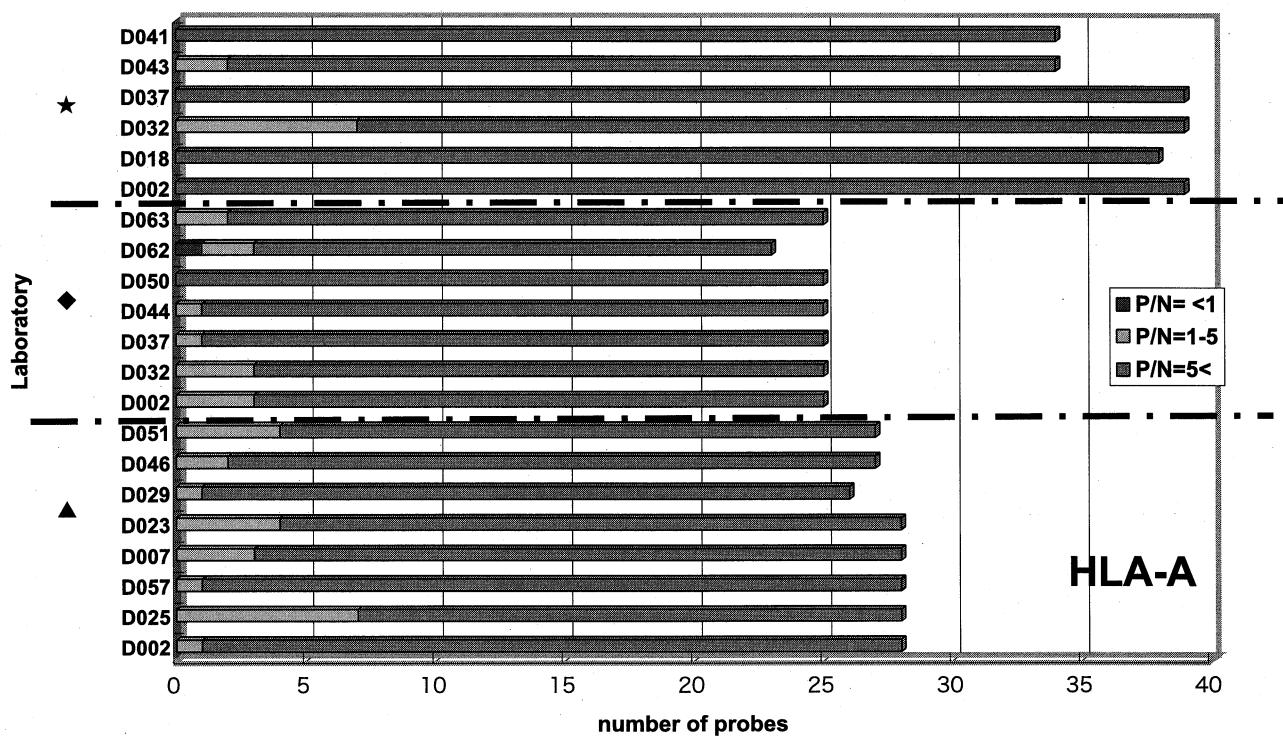


Fig. 9 The number of probes classified into three categories of P/N ratio in HLA-A typing Kits

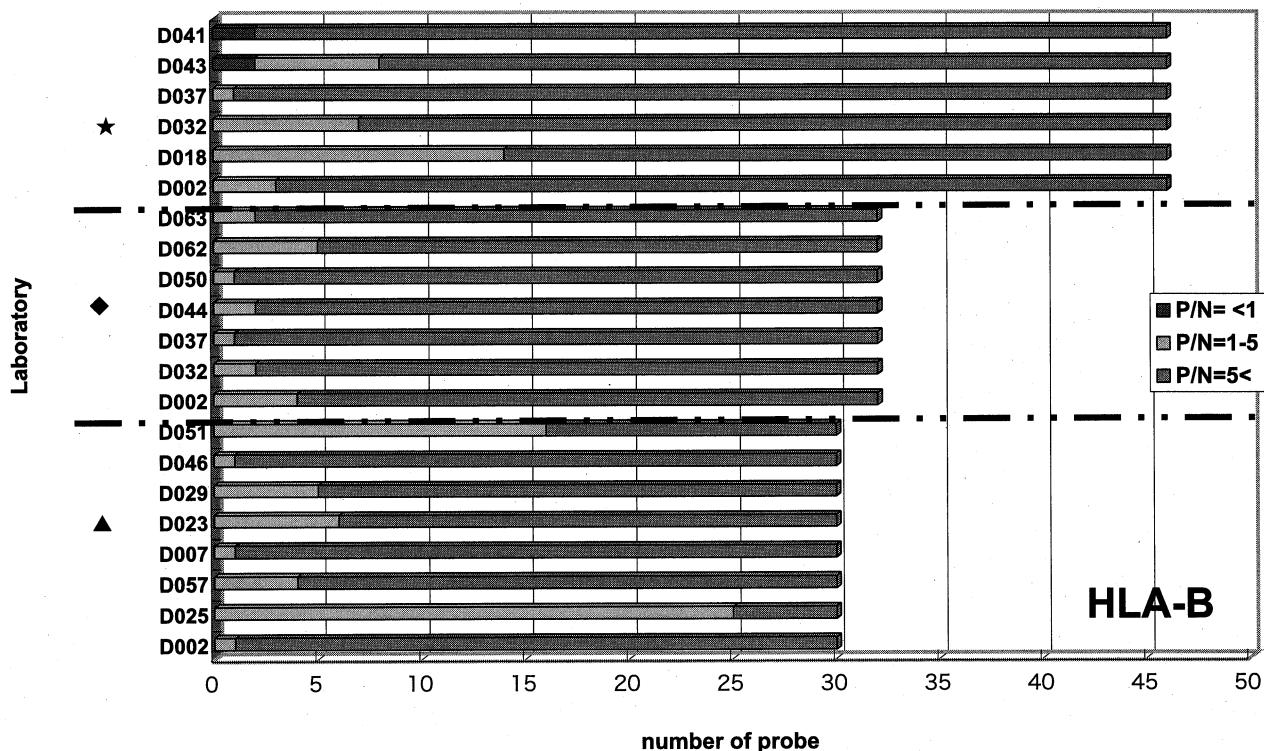


Fig. 10 The number of probes classified into three categories of P/N ratio in HLA-B typing Kits

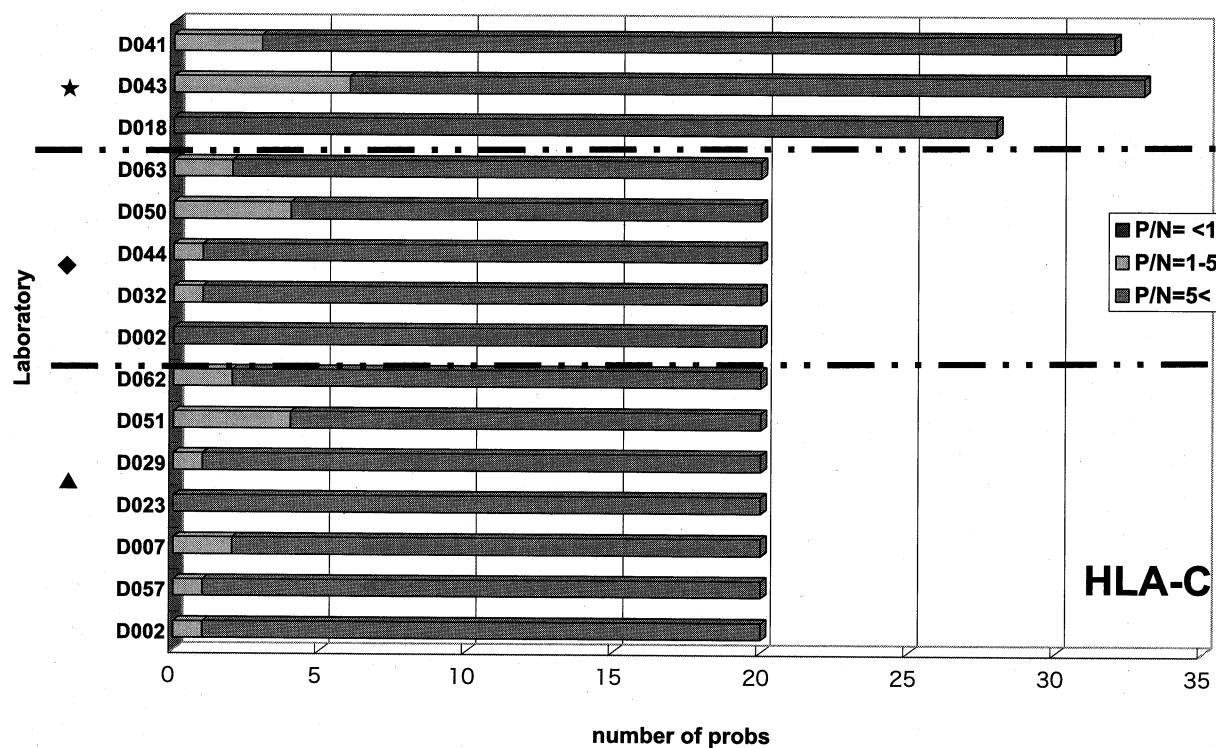


Fig. 11 The number of probes classified into three categories of P/N ratio in HLA-C typing Kits

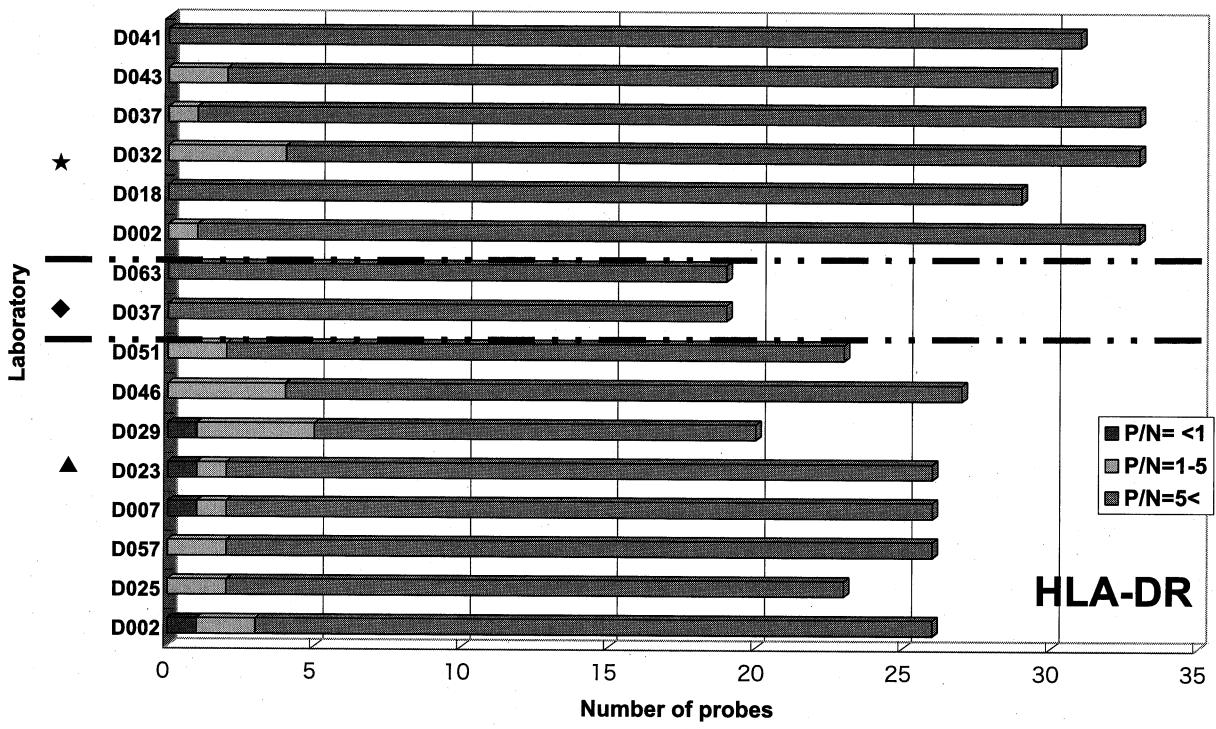


Fig. 12 The number of probes classified into three categories of P/N ratio in HLA-DR typing Kits

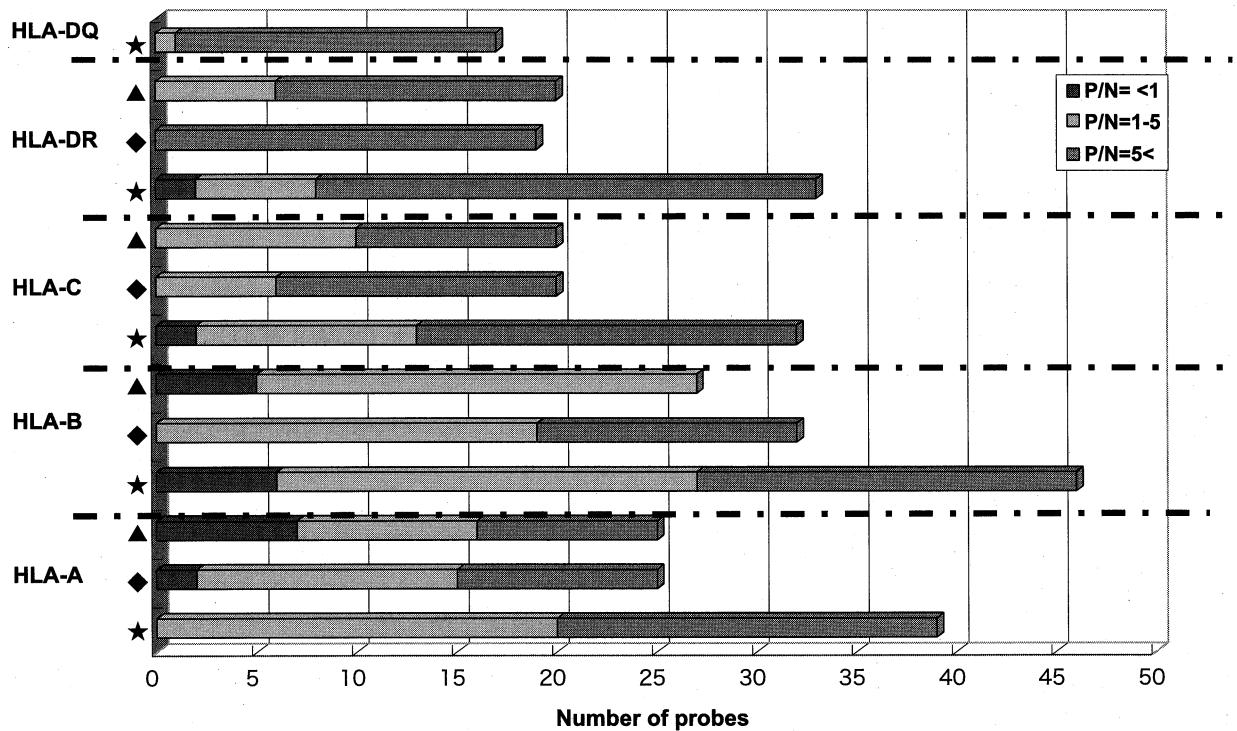


Fig. 13 The number of probes classified into three categories of P/N ratio in HLA-Typing Kits

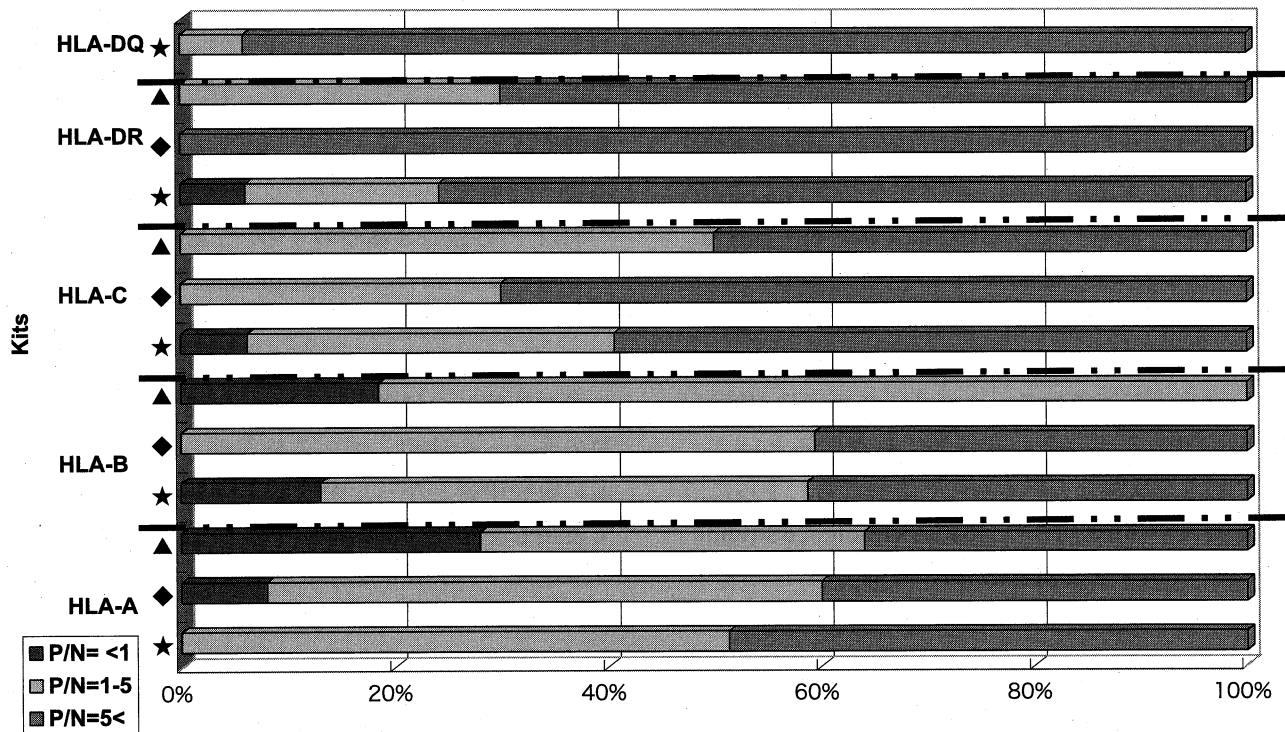


Fig. 14 Percentage of probes classified into three categories of P/N ratio in each Kit

# 第9回 HLA-QC ワークショッップレポート —方法論別検討 SBT, RFLP, SSCP—

木村彰方<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>10)</sup>, 太田正穂<sup>3)</sup>, 柏瀬貢一<sup>4)</sup>, 小林 賢<sup>5)</sup>, 酒巻建夫<sup>6)</sup>,  
佐田正晴<sup>7)</sup>, 田中秀則<sup>4)</sup>, 中島文明<sup>8)</sup>, 成瀬妙子<sup>9)</sup>, 丸屋悦子<sup>10)</sup>, 安波道郎<sup>1,2)</sup>

(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) 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. はじめに

本項ではその他の方法として, SBT (Sequencing based typing), RFLP (restriction fragment length polymorphisms), SSCP (single strand conformation polymorphisms) の各方法での結果について述べる。それぞれの方法論については既に前回までのワークショッップレポート等に述べられているのでそれらを参照願いたい。

## 2. 参加施設・方法の採用状況

今回のワークショップで回答が寄せられた解析方法の内訳を表1に示した。(各方法をクラスI, クラスIIに分けて記載した。) SBT 法ではクラスI, II を共に採用している施設がほとんどであったが, RFLP, SSCP 法ではほとんどの施設でクラスIIのみの採用となっていた。これは、RFLP 法や SSCP 法が、対立遺伝子数の多いクラスIでは操作が煩雑で、識別不能な組み合わせが多く存在するという、効率の悪さを反映しているものと思われる。さらに、昨年1施設が採用していた RSCA (reference strand-mediated conformation analysis) 法は、今年度採用

の施設はなかった。

## 3. 方法別結果と考察

### 3.1 SBT 法

#### 3.1.1 概況

SBT 法は、結果を提出した8施設全てで DRB1 遺伝子の解析が行われていたが、その他のクラスII 遺伝子については1施設のみ解析を行っていた。逆にクラスIでは A, B 遺伝子が7施設、C 遺伝子が5施設となっており、やはり対立遺伝子が多く解析が複雑なクラスIにおいては、SBT 法が活用されているようである。

SBT に参加の8施設のうち、5施設は他法と併用して用いており、SSO 法 (Luminex を含む) と RFLP 法での識別不可能な組み合わせの確認や、ホモとヘテロの区別の補助としての使用も多く見られた。次に参加施設での試薬の使用状況を表2に示した。複数のキットを使用している施設が2施設あったが、既に販売中止となったキットを保存し、必要に応じて使用していた。これは主に各キットにより用いるプライマーのデザインが異なる、つまり標的として

表1 解析方法(単位: 施設)

SBT		RFLP		SSCP		その他	
クラスI	クラスII	クラスI	クラスII	クラスI	クラスII	クラスI	クラスII
7	8	1	5	0	2	0	0

昨年度2施設で採用されていたRSCAは0であった。

いる遺伝子の増幅領域が異なるためであり、キットの使い分けにはそうした情報を頭に入れておくことが肝要である。

### 3.1.2 解析結果

クラス I の A, B, C 遺伝子については、各施設からの解答は、使用したキットに依存して、(1) 6 桁表記と 4 桁表記に分かれる、(2) 識別可能な対立遺伝子が異なる、(3) 識別可能な組み合わせが異なるなどの特徴がみられたが、判定結果は全施設で一致していた。特に、他法では 4 桁での識別が難しい B\*1519, B\*510101 などの対立遺伝子が、SBT 法では区別が可能であった。

しかし、ろ紙サンプルである 5 番、6 番については、十分な量の DNA が得られず、PCR での増幅が上手く行われないなどの理由により検出不能となっていた施設もみられた。

クラス II では、DRB1 遺伝子の解答において、表 3 のように判定結果に不一致が見られた。不一致の解答はラボ 8 に集中してみられ、さらに対立遺伝子

の片方を検出できていないなどの問題が見られた。この施設では自家製試薬を使用していたが、既知対立遺伝子型 DNA を用いるなどの十分な検討を行わずに QC サンプルへの使用を行ったためこのような結果となった。さらに判定は SBT のみで行っていた。今回、自家製試薬を使用している 3 施設のうち 2 施設は SBT 法単独の使用であった。ラボ 1 は自家製試薬を使用し、SBT 法のみで判定を行っていたが、解答は他施設と一致していた。

### 3.2 RFLP 法

RFLP 法への参加は 5 施設で、クラス I への参加はなかった。内訳は DQB1 が 4 施設、DRB1 が 2 施設、DQA1, DPB1 がそれぞれ 1 施設となっていた。これらはすべて自家製の試薬よりタイピングされていた。結果は概ね他法での結果と一致していたが、1 施設が H1702 のサンプルにおいて、DQB1\*0501, 0502 が \*0501, 0503 と assign していた。原因はヘテロのバンドパターンの単純な見誤りであった。この施設は RFLP 法には熟達していたが、判定の際のダブルチェックで見逃しがれていた。

### 3.3 SSCP 法

今回の参加は 2 施設のみであったが、うち 1 施設は DRB1, DRB3/4/5, DQB1, DPB1 遺伝子について実施されていた。2 施設が参加した DQB1 遺伝子における施設間でのデータはよく一致しており、残りの遺伝子座についても他法の結果とよく一致していた。

## 4. まとめ

いずれの方法も参加施設が多くはなく、詳細な解

表 3 DRB1 遺伝子タイピング解答 (SBT 法)

QCサンプル						
Lab.	H1701	H1702	H1703	H1704	H1705	H1706
ラボ 1	1501, 1405	1502, 1001	1602, -	1104, 1201/06	1201/06, -	0101/07, -
ラボ 2	150101, 1405	150201/100101	160201, -	1104/18, 1201/02/06	1201/06, -	0101, -
ラボ 3-1	150101, 1405	150201/100101	160201, -	110401, 1201/06		
ラボ 3-2	150101, 1405	150201/100101	160201, -	1104/18, 1201/02/06	1201/06, -	0101, -
ラボ 4	1501/05, 1405/45	150201/100101	1360/ 1602	1104/06/18, 1201/02/03+	1201/06/10, -	0101/07, -
ラボ 5	150101, 140501	150201/100101	160201, -	1104/18, 1201/02	120101, -	010101, -
ラボ 6	1501/05, 1405/45	150201/100101	160201, -	1104/06/18, 1201/02/03+	1201/06/10, -	0101/07, -
ラボ 7	1501/05, 1405/45	150201/100101	1360/ 1602	1104/06/18, 1201/02/03+	1201/06/10, -	0101/07, -
ラボ 8	1501, nt	1502	1602	0301, 1306	0301, 0804	0101, -

析を行うことは難しいが、得られた結果の一致度は高かった。RFLP 法、SSCP 法ではクラス II 遺伝子の確認検査法としては簡便で高精度であることの裏付けではないかと考えられる。しかし、SBT 法、RFLP 法でみられたミスタイピングは、ともにそれ

ぞれの方法を単独で使用していたことから誤判定を防げなかったとみられることから、やはりどのような方法も、少なくとも 2 法を併用して判定を行うことが望ましいと思われる。

## 第9回 HLA-QC ワークショップレポート テーマ別データ検討報告 —HLA-A\*02 および B\*15 アリル群について—

木村彰方<sup>1,2)</sup>、赤座達也<sup>10)</sup>、太田正穂<sup>3)</sup>、柏瀬貢一<sup>4)</sup>、小林 賢<sup>5)</sup>、酒巻建夫<sup>6)</sup>、  
佐田正晴<sup>7)</sup>、田中秀則<sup>4)</sup>、中島文明<sup>8)</sup>、成瀬妙子<sup>9)</sup>、丸屋悦子<sup>10)</sup>、安波道郎<sup>1,2)</sup>  
(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. はじめに

社会一般の国際化が進み、医療・組織適合検査の現場でも検体が日本人に限らなくなると、データを解釈して型判定する際に試料の民族的な由来を考慮する必要が生じてくることが予想される。HLA-A\*02 および B\*15 アリル群には、いずれも 100 を超えるアリルが登録されているが、民族によってどのアリルがどのくらいの頻度で分布しているかに違いがある。HLA-A\*02 アリル群は 2 衡精度のタイピングの一一致では拒絶反応を惹起する可能性があり、

表 1 A\*02 アリル群、B\*15 アリル群を有する検体

	検体 ID	アリル
A*02 アリル群	H1702	A*0203
	H1703	A*0204
	H1704	A*0216
	H1705	A*0201
B*15 アリル群	H1701	B*1502
	H1702	B*1519

また B\*15 アリル群についてはその血清対応型が複雑であることから、高精度タイピングの実施が求められる状況にあるため、今回のテーマとしてこれらのアリルを有する検体を採用し、採用する方法論の問題点とデータ解釈における問題点を検討することとした。

### 2. 検体

第9回 HLA-QC ワークショップでは日本組織適合性学会倫理問題検討委員会の指針に基づき、すでに学術論文に記載されているか、あるいは公的な細胞バンクから公開されている細胞株を採用し、細胞名を伏せた形で使用した。A\*02 アリル群、B\*15 アリル群を有する検体を表 1 に示す。

### 3. 各施設のタイピングデータ

DNA-QC ワークショップに参加した施設のうち、63 施設からの A 座、B 座の総合判定の結果を表 2

表2 各施設の総合判定とタイピング方法

施設コード	A*02 アリル群					B*15 アリル群		タイピング方法	注釈
	A*02 of H1702	A*02 of H1703	A*02 of H1704	A*02 of H1705	B*15 of H1701	B*15 of H1702			
D-001	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/04/07/+	B*1502	B*1512/19	SSO		
D-002	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/04/07/+	B*1502	B*1512/19	SSO	B	
D-003	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/04/07/+	B*1502	B*1501/12/19	SSO	A	
D-004	A2	A2	A2	ND	B75	B62	SSP		
D-005	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/07/09/+	B*1502	B*1501/12/19	SSO	A	
D-006	A*0203	A*0201/04/07/+	A*0216	A*0201/04/07/+	B*1502	B*1501/12/19	SSO	A	
D-007	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/04/09/+	B*1502	B*1501/12/14/+	SSO	B	
D-008	A*0203	A*0204	A*0216	A*0201	B*1502	B*1512/19	SBT		
D-009	0201/02/03/+	0201/02/03/+	0201/02/03/+	ND	B*1502	B*1512/14/19	SSP		
D-010	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/04/09/+	B*1502/88	B*1512/19	SSO		
D-011	A2	A2	A2	ND	B75	B76	SSP		
D-012	A*0203	A*0204	A*0216	A*020101	B*1502	B*1519	SBT+SSO	B	
D-013	A*0203	A*0204/17	A*0215	A*0201/07/15/+	B*1502	B*1512/19	SSO		
D-014	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/07/09/+	B*1502	B*1512/19	SSO		
D-015	A*0203	A*0204	A*0201/09/11/+	A*0201/07/09/+	B*1502/13/31	B*1501/04/12/+	SSO		
D-016	A*0203	A*0201/04/07/+	A*0216	A*0201/04/07/+	B*1502	B*1512/19	SSO		
D-017	A*0203	A*0204	A*0216	A*0201/04/07/+	B*1502	B*1512/19	SSO (+SSP)		
D-018	A*0203	A*0204/17	A*0216	A2	B*1502	B*1512/19	SSO	B	
D-019	A*0203	A2	A2	ND	B*1502	B*1501/04/07/+	SSP(+SSO)		
D-020	A*0203	A*0201/07	A*0201/07/18/+	A*0201/07	B*1502	B*1501	SSO		
D-021	A*0203	A*0201/07/+	A*0216	A*0201/07/+	B*1502	B*1512/19	SSO		
D-022	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/07/09/+	B*1502/88	B*1512/19	SSO		
D-023	A2	A2	A2	A2	B*1502	B*1512/19	SSP+SSO		
D-024	A2	A2	A2	ND	B*15(B75)	B*15(B76)	SSP		
D-025	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/04/09/+	B*1502	B*1501/12/14/+	SSO	B	
D-026	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/07/15/N+	B*1502/88	B*1512/19	SSO		
D-028	A2	A2	A2	A2	B*15(B75)	B*15(B62)	SSO		
D-029	A*0203	A*0204	A*0216	A*020101	B*1502	B*150101	SSO	B	
D-030	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/07/15/+	B*1502	B*1512/19	SSO		
D-031	A*0203	A*0204	ND	A*020101	B*1502	B*1519	SBT		
D-032	A*0203	A*0204/33/58	A*0216	A*0201/04/09/+	B*1502	B*1512/19	SSO	B	
D-033	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/07/09/+	B*1502	B*1512/19	SSO		
D-034	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/04/07/+	B*1502	B*1512/19	SSO+SSP		
D-035	A2	A2	A2	ND	B*1502	B*1501/04/07/+	SSP		
D-036	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/07/09/+	B*1502/88	B*1512/19	SSO		
D-037	A2	A2	A2	A2	B*1502	B*1512/19	SSO(+SSP)	B	
D-039	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/07/09/+	B*1502	B*1512/19	SSO		
D-040	A*0203	A*0204	A*0201/07/09/+	A*0201/07/09/+	B*1502/13/31	B*1501/04/12/+	SSP+SSO		
D-041	A*020301	A*0204	A*0216	A*0201/01L/04/+	B*1502	B*1519	SSO+SBT	B	
D-042	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/04/07/+	B*1502	B*1512/19	SSO		
D-043	A*0203	A*0201/04	A*0216	A*0201/01L/04/+	B*1502	B*1512	SSO+SSP	B	
D-044	A*0203	A*02	A*0216	A*02	B*15	B*15	SSO	B	
D-045	A*0203	A*0201/04/07/+	A*0216	A*0201/04/07/+	B*1502	B*1512/19	SSO		
D-046	A*020301	A*0204	A*0216	A*020101	B*1502	B*1519	SBT+SSO	B	
D-047	A2	A2	A2	ND	B75	B62	SSP		
D-048	A*02	A*02	A*02	ND	B*1502	B*1512/14/19	SSP		
D-049	A*0203	A*0201/07/09/+	A*0216	A*0201/07/09/+	B*1502/88	B*1512/19	SSO		
D-050	A*0203	A*0204/17/58/+	A*0216	A*0201/04/09/+	B*1502/88	B*1501/12/14/+	SSO	B	
D-051	*0203	*0204/17	*0216	*0204/17	B*1502	B*1501/12/14/+	SSO	B	
D-052	A*020301	A*0204	A*0216	A*020101	B*1502	B*1519	SBT+SSO		
D-053	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/07/09/+	B*1502	B*1512/19	SSO		
D-054	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/04/07/+	B*1502	B*1512/19	SSO+SSP	A	
D-055	A*0203	A*0204	A*0216	A*0201	B*1502	B*1512/19	SSO+SSP		
D-056	A2	A2	A2	ND	B*1502	B*1512/14/19	SSP		
D-057	A*0203	A*0204/17	A*0216	A*0201/04/09/+	B*1502	B*1501/04/12/+	SSO	B	
D-058	A*02	ND	A*23	ND	B*1502	B*1501/04/07/+	SSP		
D-059	A2	A2	A2	A2	B*15(B75)	B*15(B76)	SSP		
D-060	A*02	A*02	A*02	A*02	B*15	B*15	SSO		
D-061	A2	A2	A2	ND	B*1502	B*1512/14/19	SSP		
D-062	A*020301	A*0204	A*0216	A*020101	B*1502	B*1519	SBT+SSO	B	
D-063	A*0203	A*0204/17/58/+	A*0216	A*0201/04/09/+	B*1502/88	B*1501/4805/+	SSO	B	
D-065	A2	A2	A2	ND	B*1502	B*1512/14/19	SSP		
D-066	A2	A2	A2	ND	B*1502	B*1512/14/19	SSP		

提出データの「総合判定」欄に記載されたDNA型（一部血清対応型）より転記した。

ND：未検。

方論的に問題があったものに薄く、判定に問題があると思われるものに濃く色づけした。

括弧( )内のタイピング方法は補助的に施行されたもの。

注釈 A: ラインプローブを用いたSSOで、古いversionのプローブ使用。 B: ビーズアレイによるSSO (Luminex法)。

にまとめた。

A 座での 2 桁レベル(粗分別または血清対応型)の誤り ( $A^*02 > A^*23$ ) は、型判定の際の問題と考えられた。また、施行した方法では決定できないはずの精度までの高精度の型判定をした施設、逆に高精度の型判定可能な方法を採用しているにも拘らず 2 桁レベルの型判定をした施設が見受けられた。(詳細は「方法論別解説」のそれぞれの項を参照。) 方法論の限界として SSP の一般向けあるいは日本人用キット単独使用の場合には、 $A^*02$  アリル群を細分化はできないものがあり、ラインプローブを用いた SSO の古い version のものやビーズアレイを用いた SSO (いわゆる Luminex 法)の一部のキットでは、 $B^*15$  アリル群の中で異なる血清対応型のものを区別できていない点に注意が必要である。

#### 4. HLA-A\*02 および B\*15 アリル群の頻度分布

2005 年 7 月 12 日付けで更新された IMGT database (release 2.10) では、A アリルの総登録数 396 のうち  $A^*02$  アリル群は 103 アリル ( $A^*02010101$  から  $A^*0286$  まで), B アリル 699 のうち  $B^*15$  アリル群は 109 アリル ( $B^*15010101$  から  $B^*9504$  まで) を占めている。2002 年の HLA nomenclature [1] で 8 桁の数でアリル表記することになった際に 3 桁目と 4 桁目で、血清型を保ったままの非同義置換を 100 種まで命名可能にするように割り当て、それを越えた際には、 $A^*02$  アリル群には  $A^*9201$  から始まる番号を、 $B^*15$  アリル群には  $B^*9501$  から始まる番号を割り振るように決められていた。2005 年 3 月 22 日に、 $B^*15$  アリル群の新規アリルに  $B^*9501$

表 3 日本人の  $A^*02$  群アリル、 $B^*15$  群アリルの頻度

アリル 頻度(%)		
A*02 群	$A^*0201$ 10.71	(2n=1046)
	$A^*0206$ 8.99	
	$A^*0207$ 2.87	
	$A^*0210$ 0.76	
$B^*15$ 群	$B^*1501$ 9.37	(2n=1046)
	$B^*1507$ 0.36	
	$B^*1511$ 0.96	
	$B^*1518$ 1.72	

(文献[2]より抜粋)

が割り当てられ、2005 年 4 月 8 日更新のデータベース (release 2.9) で上 2 桁が 95 での  $B^*15$  アリル群が初めて現れることとなった。

日本人集団の HLA-A\*02 および  $B^*15$  アリル群の頻度分布 [2] を表 3 に、世界諸地域での頻度分布を表 4 に示す。日本人で両群ともに表 3 に示すもの以外のアリル頻度は 0.1% 以下であると見込まれる。

#### 5. HLA-A\*02 および $B^*15$ アリル群の血清型

これまでに登録されている HLA-A\*02 および  $B^*15$  アリル群の血清型を表 5 に示す(詳細は文献 [3] 参照)。アリル名の末尾が “N” であるものは、HLA 分子が細胞表面に発現しないため血清型は「ブランク」である。

#### 6. 結語

HLA-A\*02 および  $B^*15$  アリル群にはそれぞれ 100 種を超えるアリルが登録され、その数は今後も増加すると思われる。日本人であることを想定して型判定をすると、それぞれ 4 つのアリルのいずれかをアサインしてしまうことになるが、世界の各民族集団ではその頻度分布が異なっていることを念頭にいれ、タイピングデータとしてはありうるすべての可能性を包含した表記法を採用し、そのデータを解釈する際に試料の民族的な由来を考慮に入れるようすべきと思われる。

#### 参考文献

- [1] Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GMTh, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI: Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. European Journal of Immunogenetics (2002) 29: 463–517, Human Immunology (2002) 63: 1213–1268, Tissue Antigens (2002) 60: 407–464
- [2] 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 卷 1 号, 2001 年
- [3] Schreuder GMTh, Hurley CK, Marsh SGE, Lau

表4 世界諸地域でのHLA-A\*02およびB\*15アリル群の頻度分布

HLA-A	オーストラリア		ヨーロッパ		北アフリカ		東北アジア		オセアニア		その他地域		東南アジア		西南アジア		サハラ以南のアフリカ		
	2n=810	頻度	2n=3657	頻度	2n=278	頻度	2n=1084	頻度	2n=1058	頻度	2n=388	頻度	2n=1089	頻度	2n=5047	頻度	2n=734	頻度	
A*0201	103	0.127	995	0.272	49	0.176	157	0.145	162	0.144	248	0.228	106	0.221	406	0.169	116	0.158	
A*0202	3	0.001	1	0.004	3	0.003	4	0.004	1	0.003	12	0.011	299	0.051	7	0.010	156	0.044	
A*0203			0.000				1	0.001	12	0.011	1	0.001	4	0.011			1	0.000	
A*0204											17	0.016	1	0.001	26	0.035	2	0.001	
A*0205			42	0.011	2	0.007	3	0.003	76	0.072	20	0.052	305	0.052	1	0.001	122	0.034	
A*0206			3	0.001	118	0.109	31	0.029	3	0.008			400	0.068			3	0.001	
A*0207			1	0.000															
A*0208																			
A*0209																			
A*0210																			
A*0211																			
A*0212																			
A*0213																			
A*0214																			
A*0216																			
A*0217																			
A*0219																			
A*0220																			
A*0222																			
A*0224																			
A*0225																			
A*0226																			
A*0228																			
A*0233																			
A*0234																			
A*0236																			
A*0240																			
A*0244																			
A*0245																			
A*0246	103	0.127	1057	0.289	52	0.187	281	0.259	310	0.283	80	0.206	320	0.294	191	0.398	1435	0.245	
A*02	810	1.000	3657	1.000	278	1.000	1084	1.000	1058	1.000	388	1.000	1089	1.000	480	1.000	5847	1.000	
アリル合計																			
HLA-B	頻度		頻度		頻度		頻度		頻度		頻度		頻度		頻度		頻度		
B*1501	3	0.004	174	0.048	頻度	頻度	2n=3644	頻度	頻度	頻度	2n=1039	頻度	頻度	2n=760	頻度	頻度	2n=966	頻度	頻度
B*1502	1	0.001	5	0.001	3	0.011	1	0.001	2	0.003	50	0.068	1	0.003	33	0.085	24	0.025	
B*1503											1	0.001			18	0.019	1	0.002	
B*1504															54	0.112	2	0.007	
B*1505															1	0.001			
B*1506	3	0.004	3	0.001					3	0.003	2	0.003	2	0.005			164	0.030	
B*1507			3	0.001					1	0.001					314	0.057		17	
B*1508			3	0.001					1	0.001					2	0.000		4	
B*1509			2	0.001					1	0.001					13	0.018		271	
B*1510			4	0.001					3	0.004					1	0.001		0.075	
B*1511									11	0.014	1	0.003			5	0.010		2	
B*1512									12	0.016					9	0.009		0.001	
B*1513											6	0.015			15	0.039		22	
B*1515											1	0.001			4	0.008		0.004	
B*1516											1	0.001			5	0.010		1	
B*1517											5	0.005			4	0.008		0.001	
B*1518											2	0.002			6	0.006		21	
B*1520											1	0.001			3	0.001		0.002	
B*1521	86	0.106									15	0.039			4	0.008		14	
B*1523											6	0.015			1	0.001		0.004	
B*1524											1	0.001			1	0.001		1	
B*1525	34	0.042	1	0.000					1	0.001	4	0.005			3	0.001		1	
B*1527									1	0.001	3	0.008			1	0.001		0.002	
B*1528									1	0.001			1	0.001	11	0.027		1	
B*1529															29	0.005		14	
B*1530															1	0.001		0.004	
B*1531															20	0.004		4	
B*1532															1	0.001		0.001	
B*1534															1	0.001		1	
B*1535															150	0.027		1	
B*1536															11	0.002		1	
B*1537															3	0.004		21	
B*1538															2	0.000		14	
B*1539															1	0.001		4	
B*1542															1	0.000		2	
B*1555															1	0.000		1	
B*1558															1	0.000		1	
B*1564															1	0.000		1	
B*1567															1	0.000		1	
B*1515	127	0.156	213	0.058	9	0.033	88	0.085	89	0.117	81	0.209	83	0.086	82	0.170	772	0.141	
B*1516	812	1.000	3644	1.000	272	1.000	1039	1.000	760	1.000	388	1.000	966	1.000	482	1.000	5489	1.000	
アリル合計															717	1.000	3624	1.000	

表5 HLA-A\*02 および B\*15 アリル群の血清型<sup>§</sup> (脚注参照)

A*02アリル群					
アリル	血清型	アリル	血清型	アリル	血清型
A*02010101	2	A*022002	2	A*0255	2/28
A*02010102L	2	A*0221	2	A*0256	2
A*020102	2	A*0222	2	A*0257	2
A*020103	2	A*0224	2	A*0258	2
A*020104	2	A*0225	2	A*0259	2
A*020105	2	A*0226	2	A*0260	2
A*020106	2	A*0227	2	A*0261	2
A*020107	2	A*0228	2	A*0262	2
A*020108	2	A*0229	2	A*0263	2
A*020109	2	A*0230	2	A*0264	2
A*020110	2	A*0231	2	A*0265	unknown
A*020111	2	A*0232N	<blank>	A*0266	unknown
A*0202	2	A*0233	2	A*0267	unknown
A*020301	2	A*0234	2	A*0268	unknown
A*020302	2	A*023501	2	A*0269	unknown
A*0204	2	A*023502	2	A*0270	unknown
A*0205	2	A*0236	2	A*0271	unknown
A*020601	2	A*0237	2	A*0272	unknown
A*020602	2	A*0238	2	A*0273	unknown
A*020603	2	A*0239	2	A*027401	unknown
A*0207	2	A*0240	2	A*027402	unknown
A*0208	2	A*0241	2	A*0275	unknown
A*0209	2	A*0242	2	A*0276	unknown
A*0210	2	A*0243N	<blank>	A*0277	unknown
A*0211	2	A*0244	2	A*0278	unknown
A*0212	2	A*0245	2	A*0279	unknown
A*0213	2	A*0246	2	A*0280	unknown
A*0214	2	A*0247	2	A*0281	unknown
A*0215N	<blank>	A*0248	2	A*0282N	<blank>
A*0216	2	A*0249	2	A*0283N	<blank>
A*021701	2	A*0250	2	A*0284	unknown
A*021702	2	A*0251	2	A*0285	unknown
A*0218	2	A*0252	2	A*0286	unknown
A*0219	2	A*0253N	<blank>		
A*022001	2	A*0254	2		

B*15アリル群					
アリル	血清型	アリル	血清型	アリル	血清型
B*15010101	62	B*1530	62	B*1568	70
B*15010102N	<blank>	B*1531	62/75	B*1569	70
B*150102	62	B*1532	62	B*1570	62
B*150103	62	B*1533	62	B*1571	62
B*150104	62	B*1534	62	B*1572	70
B*150105	62	B*1535	62	B*1573	62
B*1502	75	B*1536	13/62/77	B*1574	70
B*1503	70	B*1537	70	B*1575	62
B*1504	62	B*1538	62	B*1576	15
B*1505	62	B*1539	62	B*1577	62
B*1506	62	B*1540	62	B*1578	62
B*1507	62	B*1542	62	B*1579N	<blank>
B*1508	62/75	B*1543	62	B*1580	unknown
B*1509	70	B*1544	75	B*1581	unknown
B*1510	70	B*1545	62	B*1582	unknown
B*151101	62/75	B*1546	70	B*1583	unknown
B*151102	62/75	B*1547	70	B*1584	unknown
B*1512	62/76	B*1548	62	B*1585	unknown
B*1513	77	B*1549	70	B*1586	unknown
B*1514	62/76	B*1550	62	B*1587	unknown
B*1515	62/75	B*1551	70	B*1588	unknown
B*1516	63	B*1552	70	B*1589	unknown
B*15170101	63	B*1553	70	B*1590	unknown
B*15170102	63	B*1554	70	B*1591	unknown
B*151702	63	B*1555	75	B*1592	unknown
B*1518	70	B*1556	62	B*1593	unknown
B*1519	62/76	B*1557	62	B*1594N	<blank>
B*1520	62	B*1558	62	B*1595	unknown
B*1521	75	B*1560	62	B*1596	unknown
B*1523	70	B*1561	70	B*1597	unknown
B*1524	62	B*1562	70	B*1598	unknown
B*1525	62	B*1563	62	B*1599	unknown
B*1526N	<blank>	B*1564	70	B*9501	unknown
B*1527	62	B*1565	62	B*9502	unknown
B*1528	62	B*1566	62	B*9503	unknown
B*1529	70	B*1567	63	B*9504	unknown

(IMGTおよびNMDPのデータベースより抜粋)

<sup>§</sup>アリルとその血清対応型の対応表ではなく、これらのアリルが実際に血清学でどうアサインされているかを示す。

たとえばB\*1519の血清対応型はB76であるが、B\*1519を有する細胞の血清学ではB62とアサインされたものとB76とアサインされたものがあることを示す。(62/75)

M, Fernandez-Vina M, Noreen HJ, Setterholm M, Maiers M: The HLA dictionary 2004: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ

antigens. *Tissue Antigens* (2005) 65: 1–55, *Human Immunology* (2005) 66: 170–210, *International Journal of Immunogenetics* (2005) 32: 19–69

## 第9回 HLA-QC ワークショップレポート —テーマ別検討(濾紙付着細胞について)—

木村彰方<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>10)</sup>, 太田正穂<sup>3)</sup>, 柏瀬貢一<sup>4)</sup>, 小林 賢<sup>5)</sup>, 酒巻建夫<sup>6)</sup>, 佐田正晴<sup>7)</sup>, 田中秀則<sup>4)</sup>, 中島文明<sup>8)</sup>, 成瀬妙子<sup>9)</sup>, 丸屋悦子<sup>10)</sup>, 安波道郎<sup>1,2)</sup>

(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) 日本薬科大學生物学, 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. はじめに

3年継続して濾紙に添付したサンプルからのHLA-DNAタイプを行い、QCWSに参加した各ラボのタイプ結果をもとにHLAタイプ用試料としての妥当性と有用性について検討した。本年度は、細胞添付・輸送用には昨年度使用したものと異なり、Whatman社製のFTAカードを用いた。このカードに細胞を直接添付すると、細胞が破壊され、DNAがカード上に固定される。さらに、長年室温保存したDNA固定カードからでも直接ゲノムDNAをPCRで增幅可能であることが報告されている。今回は、このFTAカードに1.5×104個/spotの細胞を添付したサンプルからのHLA-DNAタイプ結果を解析した。

### 2. 検査試料・DNA抽出法

参加施設には、FTA®カードに細胞を2spots(1.5×104個/spot)添付した2種類の試料(H1705とH1706)を配付した。H1705にはHLAタイプがA\*0201,- Cw\*0701,- B\*1801,- DRB1\*1201,- の細

胞を、H1706にはHLAタイプがA\*2402,- Cw\*0702,- B\*0702,- DRB1\*0101,- の細胞が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、タイプの手技は参加施設で行われている方法に従った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 判定に参加した施設数と判定一致率

##### 3.1.1 サンプル H1705

サンプルH1705に参加した検査室と検査結果の適合率を表2に示した。今回DNAタイプQCWSに参加した施設は65施設であったが、その中で本テーマに検査結果を提出した施設数は、タイプした遺伝子座により異なっており、最も多くの検査結果を提出したローカスはDRB1で52施設(80%)、つづいてA,Bローカスで51施設(78%)であった。提出された検査結果は各施設がルーチン検査に行っている項目を反映していると考えられる。また提出

表1 FTA カードからの DNA 抽出法

1. 円の内部（濾紙表面のピンク色が白色化したところ）から、清潔なカッター( $1\text{mm}^2$ )またはパンチ( $\phi 1.2\text{mm}$ )で切り取り、滅菌した容器（1.5mlチュウブ）に入れる。
  2. チューブに200  $\mu\text{l}$ の洗浄液（TE<sub>0.1</sub>緩衝液）を加え、軽く混合し、5分間静置後、洗浄液を除去する。
  3. (2) の操作を更に4回繰り返す。
  4. 切り抜いたカード片を乾いた濾紙またはキムワイプ上に移し、水分を取り除く。
  5. 水分を除去したカード片をPCR增幅反応溶液に入れ、PCRを行う。
- TE<sub>0.1</sub>緩衝液 (10mM TrisHCl, 0.1mMEDTANa<sub>2</sub>, pH8.0)

表2 検査結果提出施設数と一致率 (H1705)

遺伝子座	結果提出施設数 N=65	コンセンサス 遺伝子型	Low/Medium		High		総合一致率(%)	
			使用数 (%)	一致率 (%)	使用数 (%)	一致率 (%)		
HLA-A	51	78	*0201	43/51 (84)	41/43 (95)	8/51 (16)	8/8 (100)	49/51 (96)
HLA-B	51	78	*1801	45/51 (88)	45/45 (100)	6/51 (12)	6/6 (100)	51/51 (100)
HLA-C	25	38	*0701	24/25 (96)	24/24(100)	1/24 (4)	1/1(100)	25/25 (100)
HLA-DRB1	52	80	*1201	44/52 (85)	38/44 (86)	8/52 (15)	8/8 (100)	46/52 (88)
HLA-DRB3/4/5	20	31	B3*0202	15/20 (75)	15/15 (100)	5/20(25)	5/5(100)	20/20 (100)
HLA-DQA1	3	5		2/3 (67)		1/3 (33)		
HLA-DQB1	15	23	*0301	11/15 (73)	11/11 (100)	4/15 (27)	4/4 (100)	15/15 (100)
HLA-DPB1	1	2				1/1 (100)		

されたタイピング結果のコンセンサス遺伝子型との一致率は high resolution level で 100% であり, low / medium レベルでは A (95%), DRB1 (86%) を除いていずれも 100% と高い一致率を示した。これは、今回のサンプルが HLA ホモ接合体であることが判定結果の一致率を高めたと考えられる。

### 3.1.2 サンプル H1706

サンプル H1706 も各座 1 抗原を表現するホモ接合体の細胞をカードに添付したものである。サンプル H1705 で示された結果と同様、本サンプルの各施設からの判定結果はコンセンサス遺伝子型とどれも高い一致率 (100%, 但し DRB1 は 96%) を示した (表3)。また、本サンプルの結果提出施設は、H1705 サンプルの結果提出施設数とほとんど同数であった。これは、各参加施設において検査した遺伝子座が、両サンプルに共通していたことによるのであろう。

### 3.2 タイピングに用いた検査方法と施設数

全血以外からの DNA 試料で、しかも微量な DNA から HLA-DNA タイピングを施行するには検査法の

選択が必要とされる。DNA サンプルの長期保存が可能で、他施設への輸送も可能と報告されている市販の FTA® カードに添付した H1705, H1706 サンプルのタイピングに各施設で用いた方法の結果を表4 に示した。尚、本 QCWS で行われた他の 4 サンプル (H1701~H1704) はいずれも DNA 溶液 (50 ng/ml) でタイピングをしている。表に示されるように、H1705, H1706 サンプルのタイピングには、SSO 法を基準にしたタイピング法が最も多くの施設で用いられている (90% 以上)。SSP 法を用いた施設は数施設 (6% 以下) であった。一方、全サンプル (H1701~H1706) では、SSO 法を用いて検査している施設が最も多かったが (75%), SSP 法を使用した施設も相当数見られた (25%)。この結果は、多くの施設でルーチン検査に用いられている簡便な SSP 法は、微量試料からの HLA-DNA タイピングには適法でないことや検査不可能で結果を提出しないことが原因と考えられる。

HLA-DNA タイピングを SSP 法で行うには、一般に充分かつ良質な DNA が必要とするが、今回の

表3 検査結果提出施設数と一致率 (H1706)

遺伝子座	結果提出施設数 N=65 (%)		コンセンサス 遺伝子型	Low/Medium		High		総合一致率(%)
	使用数 (%)	一致率 (%)		使用数 (%)	一致率 (%)	使用数 (%)	一致率 (%)	
HLA-A	50	77	*2402	44/50 (88)	44/44 (100)	6/50 (12)	6/6 (100)	50/50 (100)
HLA-B	49	75	*0702	42/49 (86)	42/42 (100)	7/49 (14)	7/7 (100)	49/49 (100)
HLA-C	24	37	*0702	19/24 (79)	19/19 (100)	5/24 (21)	5/5 (100)	24/24 (100)
HLA-DRB1	52	80	*0101	39/52 (75)	37/39 (95)	13/52 (25)	13/13 (100)	50/52 (96)
HLA-DQA1	3	5		3/3 (100)				
HLA-DQB1	15	23	*0501	2/15 (13)	2/2 (100)	13/15 (87)	13/13 (100)	15/15 (100)
HLA-DPB1	1	2				1/1 (100)		

表4 検査報告数と検査方法

検査方法	報告数						
	A locus		B locus		DRB1 locus		H1701～H1706
	H1705	H1706	H1705	H1706	H1705	H1706	
SSO	47	46	47	46	47	47	49
SBT	6	6	6	5	7	7	8
SSP	3	3	3	3	4	4	27
RFLP					3	3	5
SSCP					2	2	2
	(n=51)	(n=50)	(n=51)	(n=49)	(n=52)	(n=52)	(n=65)

ワークショップでは SSP 法を用いて 4 ローカス (A, Cw, B, DRB1) のタイピングを正確に報告している施設が見られた。その施設は、最初に FTA カードから抽出した whole DNA について GenomiPhi DNA Amplification Kit (Amersham Biosciences Co.) を用いて遺伝子増幅を行い、その増幅産物を SSP 法でタイピングしていた。この Phi29 DNA polymerase を用いた whole genome DNA 増幅キットは医学分野では広く使われており (1-3), HLA-DNA タイピングにおいても、その有用性について本 QVWS でも検討する必要があると考えられる。

#### 4. まとめ

今回の QCWS で行った血液以外の微量試料 (FTA カードに附着した細胞) からの HLA-DNA タイピング結果は、高い正解率を示し参加施設の検査技術の良さが伺われた。さらに、データの解析結果から、今回用いたカードからの DNA 抽出や、サンプル輸送について大きな問題は認められなかったことから、

血液輸送が困難であっても今回用いた手法で HLA タイピングが可能であることが示唆された。

#### 参考文献

- 1) Lage JM, Leamon JH, Pejovic T, et al.: Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH. Genome Res, 13(2): 294–307, 2003.
- 2) Rook MS, Delach SM, Deyneko G, et al.: Whole genome amplification of DNA from laser capture-microdissected tissue for high-throughput single nucleotide polymorphism and short tandem repeat genotyping. Am J Pathol, 164(1): 23–33, 2004.
- 3) Gunderson KL, Steemers FJ, Mendoza LG, et al.: A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. Nature Genet, 37(5): 549–554, 2005.

## 第9回 HLA-QC ワークショップレポート —抗体部門報告—

木村彰方<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>10)</sup>, 太田正穂<sup>3)</sup>, 柏瀬貢一<sup>4)</sup>, 小林 賢<sup>5)</sup>, 酒巻建夫<sup>6)</sup>,  
佐田正晴<sup>7)</sup>, 田中秀則<sup>4)</sup>, 中島文明<sup>8)</sup>, 成瀬妙子<sup>9)</sup>, 丸屋悦子<sup>10)</sup>, 安波道郎<sup>1,2)</sup>

(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. はじめに

今日の HLA 抗体検査は従来法 (LCT 法) と市販試薬として入手可能な各種方法が混在する。また、血小板抗体関連の試薬でも HLA 特異性は検出可能である。さらに、クロスマッチを行った場合は使用した細胞特有の因子も考慮する必要が生じるなど、それぞれの手法でデータが持つ意味をどのように解釈するかが重要である。輸血・移植・妊娠などで產生された HLA 抗体は、時間の経過とともに簡単に変化する。したがって、抗体検査がひとりの対象者に複数回におよぶこともタイミング検査と大きく異なる点として認識しなければならない。

このような状況に加え、医療業務の要求として輸血関連では適合が目的であり、移植関連では患者抗体の監視が目的でありと施設により様々である。方法論もクロスマッチを主体とするか、PRA (Panel-reactive antibody) 検査を強化して行うか、あるいは双方を必要とするかこれもまた様々である。

以上のことから、それぞれ施設によってゴールとするところが異なるが、方法論や施設間でその整合性を欠いてはならない。特に現在は LCT 法から高感度な各種方法に移行する時期にあり、誤った解釈・判断で進まぬよう十分に検証する必要がある。よってここに抗体 QC ワークショップを実施する意義が存在すると考える。

### 2. 企画と実施内容

#### 2.1 目的

HLA 抗体検査の理解と普及。

同一検査法の結果を比較し、検査レベルを比較できるようにする。

異なる検査法の判定結果を同一手法で比較・解析できるようにする。

これらの目的達成の手段として ① できるだけ生データを集めること、② 測定結果をスコア表記で統一すること、③ 判定結果(特異性)は、対応抗原ごとにスコアで表記すること。といったことを考え、統一形式のデータファイル収集と判定スコア化を図った。

#### 2.2 サンプルの選択と配布

使用するサンプルは倫理審査で問題が生じないよう市販のヒト由来 HLA 抗血清を用いた。取扱い業者から 24 本の試用品を少量譲り受け LCT 法のプレスクリーニングで 6 本を選択し、これらを必要量購入し原液のまま各施設に 0.5 ml ずつ配布した。参加施設においてはサンプルの受領書とこれの取扱いに関する誓約書の返送を義務付けた。

これら 6 本の選択基準は以下のとおりで、別表に内容を示す。(表 1)

LCT 法で单一特異性の抗体 (SH1701, SH1702, SH1703)

IgM 抗体特異性が期待できるもの (SH1702)

LCT 法で特異性不明な抗体 (SH1704)

類似した抗原エピトープの認識が推測される抗体  
(SH1705, SH1706)

DNA 部門との連携において DNA サンプルとの反応が期待できる抗体 (SH1701, SH1705)

### 2.3 データ収集方法

Microsoft Excel で統一形式の検査方法別入力シートを以下の内容で配布し回収した。これに加え FlowPRA はヒストグラムなどの画像データファイル, LABScreen は測定機器のアウトプットファイルを別途提出。

提示した基準にしたがって方法別に測定値スコアを入力する。(表 2)

方法によっては 2 次抗体, 試薬ロット, 使用機器などを記入。

判定結果として各検査方法別判定と施設の総合判定を入力する。

検査方法間の比較を見やすくするため, 指定した抗原リストファイルに判定スコアとして陽性 (8, 6),

保留 (4), 隆性 (1), 未実施 (0) に分けて入力する。  
(表 3)

### 3. 解析結果

#### 3.1 参加施設の検査方法別内わけ

参加申込みは 48 施設で, 内訳は血液センター : 18, 大学 : 12, 病院 : 11, 企業 : 6, 他 : 1 であるが, データを提出したのは 44 施設であった。

参加施設別に検査方法, パネル形態, HLA クラス, 2 次抗体の種類などを集計した。パネル形態は Screening (HLA 抗体検出に必要な抗原を混合したスクリーニング用パネル), Specific (HLA 特異性同定用の細胞単位のパネル), Single antigen (HLA 特異性同定用单一抗原パネル) に分かれる。44 施設が 22 種類の方法で検査し, 全体で 176 系統の反応データが回収できた。

検査方法 1 種類は 21 施設, 2~3 種類は 20 施設, 4 種類以上は 3 施設であった。各施設の採用は主に LCT 法, LAT, FlowPRA, LABScreen ですみわけ

表 1 配布した QC サンプル(全てヒト由来 HLA 抗血清)

抗体QC-ID	LCT法力価	LCT法特異性	備 考
SH1701	x1	A2 A203 A210	x2→ A2のみ
SH1702	x1-2	B8	
SH1703	x1	B57 B58	
SH1704	-	(-)	FlowPRA Scr. class I (+)/ II (+)
SH1705	x1-16	B7 B48 B60 B81	
SH1706	x1	B13 B60 B61	

上記6本をこのQC IDで原液のまま0.5mlずつ配布

表 2 測定値スコアの方法別一覧表(基準)

スコア	判定	LCT AHG-	MPHA	PAK PLUS	LAT (機器)	LAT (目視)	Flow PRA	LAB Screen
8	強陽性	80%	++		80%		80%	20
6	陽性	40%		+	50%	+	50%	10
4	弱陽性	20%		W	20%	W	20%	5
2	疑陽性	10%	±		10%		10%	2.5
1	陰性	0%	-		0%		0%	1
0	未検査	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

(NBGRatio)

表3 判定スコアの基準

判定スコア	判 定	スコア化の基準
8	強陽性	確実にその抗原との反応が陽性の場合
6	弱陽性	
4	保留	判定が確定できない場合*
1	陰性	確実にその抗原との反応が陰性の場合
0	未検査	検査に使ったパネルにない抗原

\*他の抗体特異性などで反応が隠れてしまうような場合

表4 参加施設の検査方法別一覧

検査方法	抗原形態	パネル形態	測定方法	クラスI					クラスII					備 考		
				施設数	パネル数	総数	A	B	Cw	施設数	パネル数	総数	DR	DRs.	DQ	
LCT	リンパ球	Specific	目視, 数値	17	7-58	545	19	43	15	4	7-26	50	12	3	7	含Cell Tray, クロス2施設
				14	6-55	90	12	30	11	1	16	16	9	3	2	
MPHA	血小板 抽出抗原	Screening Specific	目視	G6	3	-	3	6	4	X						自家製1施設, パネル重複あり
				M1/G8	3-18	84	7	16	7	X						
PAKPLUS	血小板糖蛋白	Screening	数値	M1/G4	1	-	-	-	-	X						GMミックスあり
LAT	培養リンパ球 精製抗原	Screening Specific Single antigen	目視, 数値	*G4	46	-	21	43	15	*G4	33	-	15	3	7	パネル総数は同一 キットで重複あり
				*G4	28-56	256	21	43	15	*G4	12-36	88	15	3	7	
				G1	88	20	43	0	X							
FlowPRA	培養リンパ球 精製抗原	Screening Specific Single antigen	パターン	M6/G20	29	-	20	42	14	M4/G15	30	-	15	3	7	↑
				M1/G2	32	184	20	40	14	M1/G1	32	15	3	7		
				G3	32-56	15	40	0	X	G3	32-36	136	15	3	7	
LABScreen	培養リンパ球 精製抗原	Screening Specific Single antigen	数値	*M1/G7	35	-	21	39	15	*M1/G7	24	-	15	3	7	↑
				*M2/G9	55	968	20	42	14	*M2/G9	35	315	15	3	7	
				M1/G6	78-80	21	43	0	X							
LIFT	リンパ球	Specific	パターン	G2	10-39	49	7	23	10	X						クロス1施設

M : 2次抗体 IgM, G : 2次抗体 IgG (数字 : データ提出施設数, X : データなし, \* : クラスI/II 同時検査)

されている傾向があった。

Screening では FlowPRA が最も多くの施設で使用されていた。一方、Specific, Single antigen の同定用パネルは LABScreen の方が多い。これらはパネル総数でも LCT 法の数を超えていた。また、血小板抗体試薬は輸血関連施設で使用され、自家製パネルを使用する施設はクロスマッチの必要性があるものと推測される。(表4)

### 3.2 HLA 抗体の検出(有無)

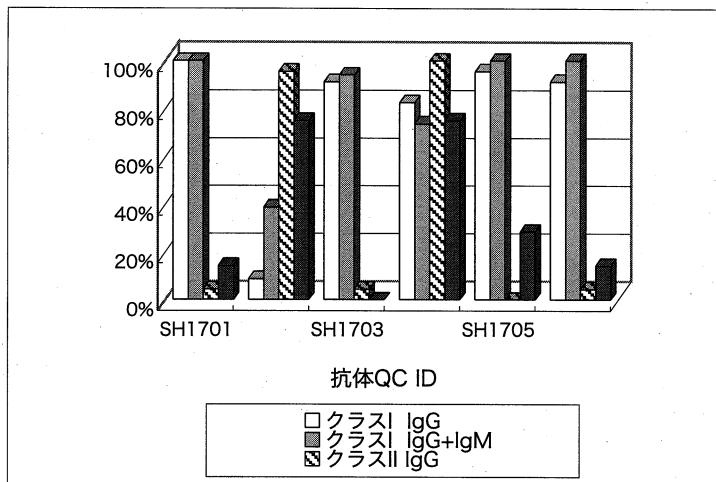
#### 3.2.1 総合判定による抗体検出率

ここでは、抗体が検出できたか否かを解析した。総合判定の抗体検出率を施設単位でサンプル別・HLA クラス別・2 次抗体別にまとめた。全体像を観察するため LCT 法の結果は IgG + IgM に加えてある。クラス I では SH1702 が IgG でほとんど検出されていない。また、クラス II は SH1702 と 1704 で

検出されている。(グラフ 1)

#### 3.2.2 検査方法別の抗体検出率

次に、検査方法別の抗体検出率をみると、クラス I では LCT 法で SH1702-1704 の検出率が低い。FlowPRA と LABScreen はほぼ 100% の検出率であるが、LAT がこれよりやや低い。MPHA 法、PAKPLUS, LIFT 法はほぼ同等の検出率であるが、PAKPLUS で SH1704 が検出できていない点は混合された抗原種類の問題あるいは感度が疑われる。SH1702 は IgM 抗体と推測され 2 次抗体に IgG を使用する方法が多いことが影響して全体的に低い。同じ検体において LCT 法もパネル内容が不十分で検出率が低い。クラス II では、SH1702 と 1704 は FlowPRA と LABScreen で 100% 検出できている。おなじく LCT 法はほとんどのサンプルで中途半端な検出に留まり、クラス I 特異性が未吸収の反応と非特異反応の双方でこのような結果になっている可



グラフ 1 抗体検出率(総合判定)

能性がある。

この分野の検査で抗体特異性は別として抗体そのものが検出できるかできないかは最も重要なことである。HLA の場合その多型性ゆえに準備すべき抗原の種類が極めて多く、種類不足で抗体を見逃すようなことがあってはならない。また、抗体の性状(Igサブクラスや補体依存性)によっても結果が左右するので注意したい。抗体の有無をスクリーニングして検出した場合はさらに抗体特異性の同定に進むケースも多いと考えられる。したがって、この段階で見逃してしまうとどうにもならない。SH1705 と 1706 のクラス I は LCT 法で通常検出できるような抗体と考えられるが、MPHA 法と LAT のスクリーニング用試薬で検出率が 100% に達しておらず問題である。MPHA 法は本来血小板抗体検出用なのでいいとしても、LAT は市販の HLA 抗体専門試薬であるから検出漏れがあってはならない。(グラフ 2)

### 3.3 HLA 抗体の特異性解析

各種方法を解析して得られた総合的な抗体特異性をサンプル別に示す。解析は専用プログラムによる判定、Q 値解析、セログラフ、各反応データ、抗原エピトープ(アミノ酸配列)の検証、FlowPRA ヒストグラムの確認などで行った。また、C ローカスの抗体特異性が不十分と考えられたので FlowPRA Single Antigen のクラス I・サプリメント(C ローカス)で追加試験を行った。(表 5)

HLA クラス +2 次抗体	クラス I IgG	クラス I IgG+IgM	クラス II IgG	クラス II IgG+IgM
SH1701	100%	100%	4%	14%
SH1702	9%	39%	96%	75%
SH1703	91%	94%	4%	0%
SH1704	83%	74%	100%	75%
SH1705	96%	100%	0%	29%
SH1706	91%	100%	4%	14%
施設数	23	21	23	8

#### 3.3.1 SH1701

SH1701 は LCT 法で HLA-A2 の単一特異性抗体に見えたが、実際には HLA-A3, A9, A28, B17 などを含む抗体で、IgG は複数の抗原エピトープに対する抗体特異性が推測できる。FlowPRA のヒストグラムでも 4~5 個のピークが認められ推測したエピトープの数とほぼ一致している。IgM も同様であるが、クラス II 特異性の検出は認められなかった。

#### 3.3.2 SH1702

SH1702 はクラス I IgG(-) IgM(+) 抗体で HLA-B8 の特異性であることから、LCT 法などでは日本人にまれな HLA-B8 のパネル細胞が含まれずに陰性と判定されている例が多い。また、市販試薬では標準添付の 2 次抗体がほとんど抗 IgG 抗体のためこのような抗体は見逃すことになる。FlowPRA のヒストグラムも 2 峰性で右側のピークは小さい。クラス II は IgG, IgM とともに DR8+ の特異性が認められた。

#### 3.3.3 SH1703

SH1703 はクラス I で IgG と IgM で全く異なる抗体特異性を持つ。LCT 法と IgM の結果が一致しているため、LCT 法で検出できない結合抗体を IgG で検出したことになる。この IgG 特異性は ABC ローカスにすべて見られ、一見何の共通性も無いようにみられるが、90 番目のアミノ酸 A → D の置換と見事に一致している。これに加え C ローカスの 73 番目のアミノ酸 T → A 置換のエピトープも抗体特異性に含まれる。クラス II 特異性は検出されていない。

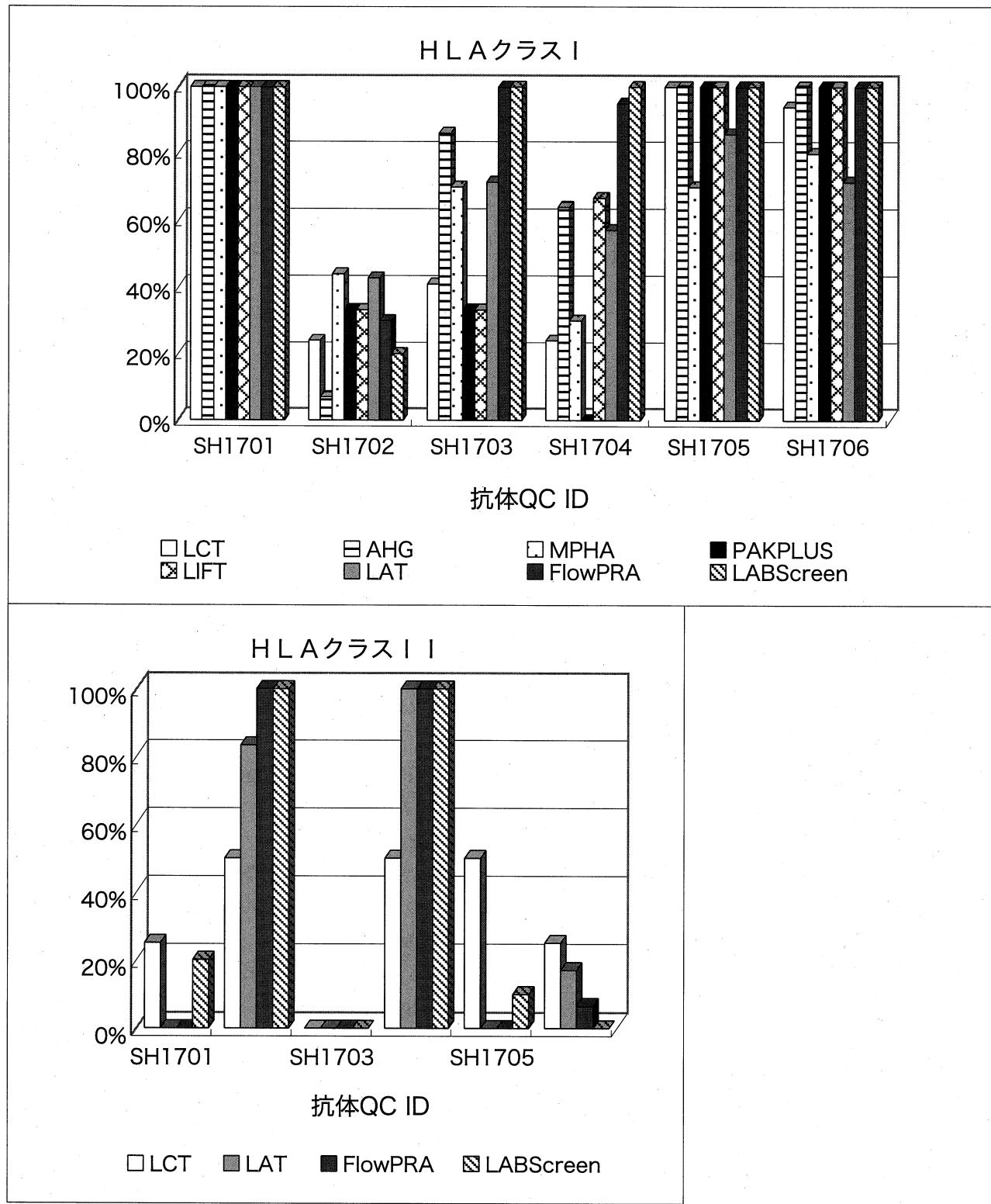


表5 HLA 抗体の特異性：サンプル別の総合的な解析結果

QC-ID	anti HLA class-I specificity			anti HLA class-II specificity	
	LCT	IgG	IgM	IgG	IgM
SH1701	A2	A2 A3 A11 A23 A24 A25 A26 A32 A68 A69 B57 B58 <i>Cw14</i>	A2 A3 A23 A24 A68 A69	-	-
SH1702	B8	-	B8	DR8 DR12	DR8
SH1703	A2 B57 B58	A1 A11 A25 A26 A34 A36 A43 A66 A80 B73 <i>Cw7 Cw4 Cw6</i> <i>Cw12 Cw17 Cw18</i>	A2 B57 B58	-	-
SH1704	?	B18 B35 B38 B39 B51 B52 B53 B56 B67 B78 <i>Cw15</i>	A31?	DR1 DR7 DR9 DR10 DR11 DR14 DR51 DR53 DQ8 DQ9 DP	-
SH1705	B7 B48 B60 B81	B7 B8 B41 B42 B48 B60 B81	B38 B39 B73 <i>Cw17</i>	-	-
SH1706	B13 B60 B61	A66 B7 B13 B27 B41 B44 B45 B47 B48 B49 B50 B60 B61 B4005 B81 <i>Cw2 Cw17</i>	-	-	-

(図1)

### 3.3.4 SH1704

SH1704 はプレスクリーニング LCT 法で反応が弱く特異性も明確でないが、FlowPRA でクラス I と II に反応が認められたサンプルである。クラス I は SH1703 と同じく IgG と IgM で全く異なり、IgM は高感度な方法でも明確な特異性はつかめていない。クラス II は IgG のみで DR 特異性の他 HLA-DR51, 53 に加え DQ, DP の特異性も認めた。

### 3.3.5 SH1705 と SH1706

SH1705 と 1706 は LCT 法では B40 関連の類似した抗体である。両サンプルともクラス II 特異性は認められない。クラス I において SH1705 は 1703, 1704 と異なり LCT 法と IgG の 2 次抗体検査法で一致している。FlowPRA のヒストグラムもきれいな 2 峰性を示し、ひとつの抗原エピトープに向かっていることが理解できる。IgM の 2 次抗体検査法でも検出できたが LCT 法や IgG とは全く異なった結果で補体依存性を示さない IgM 抗体である。どちらもひとつの抗原エピトープで説明可能な抗体特異性である。

SH1706 も LCT 法と IgG の 2 次抗体検査法が一致しており、IgM は検出されない。こちらの IgG はより多くの抗原エピトープに対する複合抗体と考え

られる。

これら両サンプルは HLA-B40 を中心とした交差反応性を示す抗体群であるが、同じ B40 関連でも SH1705 が HLA-B61 と SH1706 が HLA-B13 と全く反応しないことがアミノ酸配列の検証から明確に理解できる。(図2)

## 3.4 検査方法別の検討

### 3.4.1 LCT 法関連

LCT (AHG-LCT) 法は補体依存性の抗体しか検出しない。他の方法は全て 2 次抗体に依存した Binding assay である。したがって、LCT 法は IgG や IgM の区別なく検出するが、他法は 2 次抗体や感作粒子に左右される。さらに、LCT 法は多くの場合が自家製パネル細胞で検査され、含まれる抗原種類が不十分な場合当然その抗体特異性を見逃すことになる。よって同一条件でこれらの感度比較をするには多少無理がある。少なくとも LCT 法で検出できた抗体特異性は他法でも検出できているので、LCT 法と同等かそれ以上の感度があることは確かである。

LCT 法はほとんどが自家製パネルであるが、1 施設が市販品を使用していた。Lambda Cell Tray (略して LCT) の 30 パネルタイプで凍結細胞がテラサキトレイに分注されたものであり、LCT 法の水準を

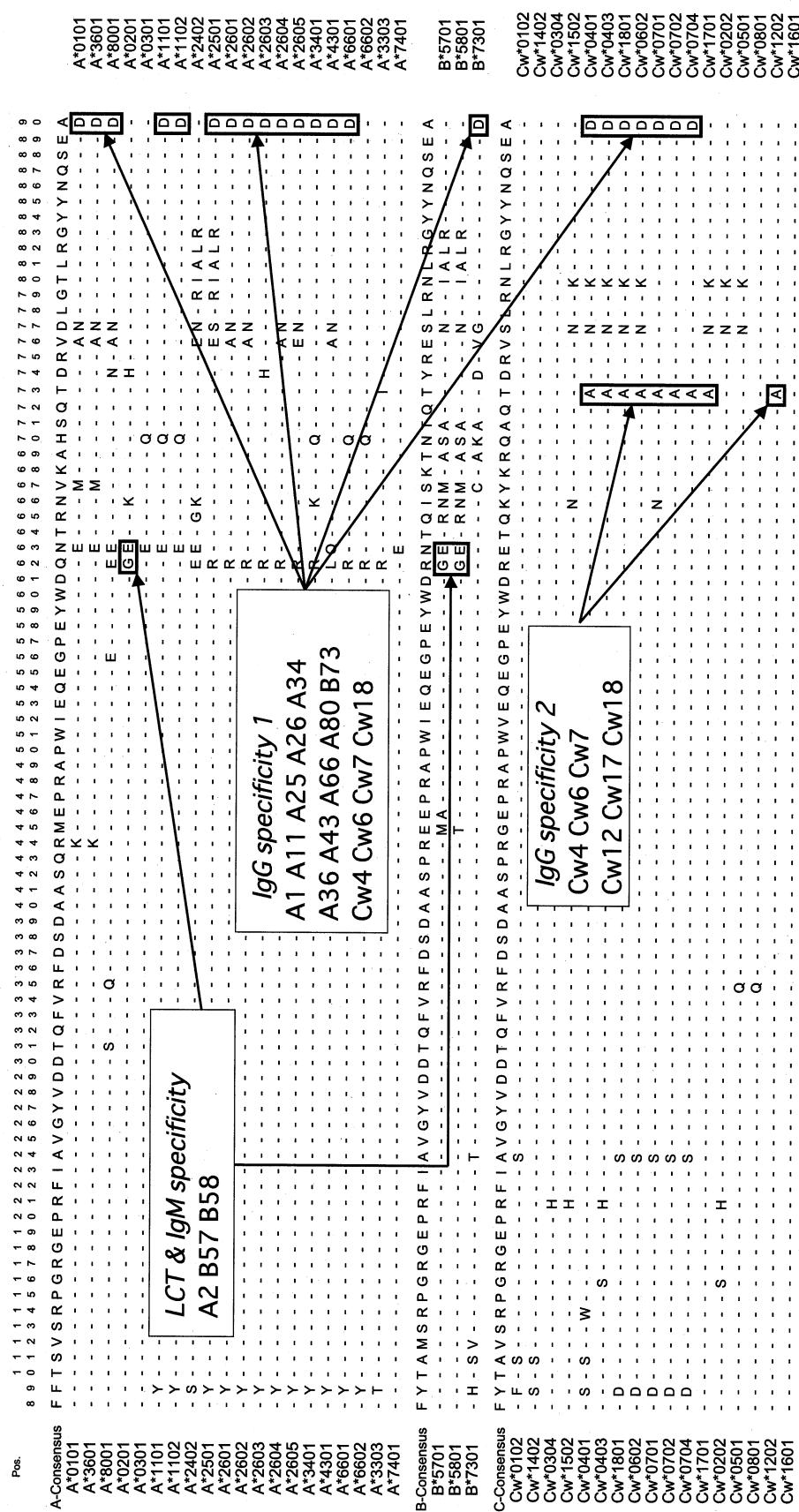


図1 HLA抗体特異性とアミノ酸配列(抗原エピトープ: SH1703)

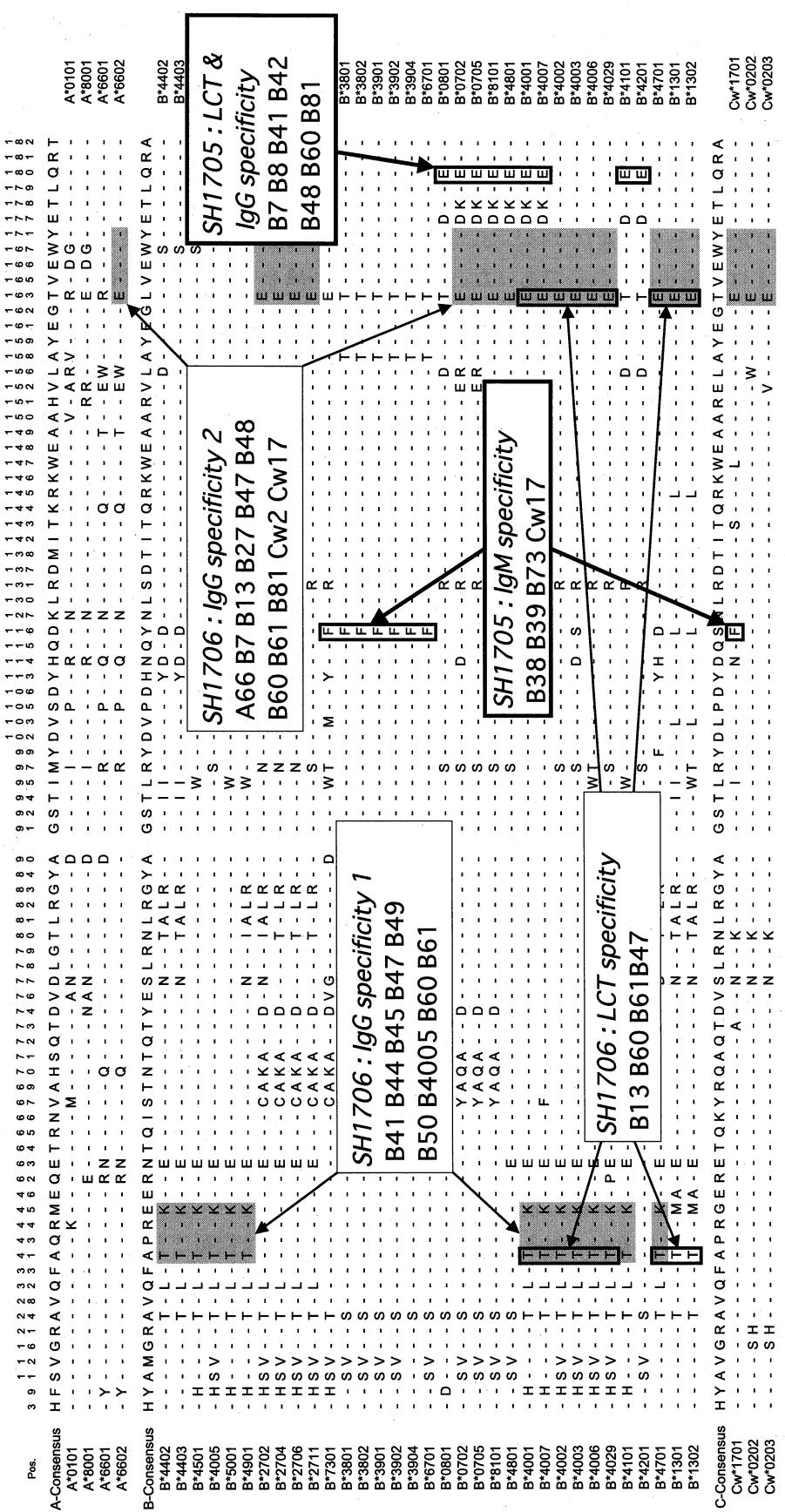


図 2 HLA 抗体特異性ヒアミノ酸配列(抗原エピトープ)の検証(サンプル: SH1705 &amp; SH1706)

維持した反応が認められた。

クラス II の場合、クラス I 特異性を吸収除去してあるかどうかが施設により異なり、我々の手落ちでその情報を入力する枠組みが欠落していたため、十分な解析ができなかった。また、AHG-LCT 法でクラス II の検査を行っていた施設があったが、この場合陰性細胞でも反応が亢進するので通常は行わない。ただし、そのデータは予想外にきれいであった。

### 3.4.2 血小板抗体検査法関連

MPHA 法は血小板抗体検出用なので HLA 用としては抗原種類が限定され、抗体特異性が抜けるところもある。今回の結果では、AHG-LCT 法と同等の検出感度が認められるが、FlowPRA や LABScreen の検出水準には達していない。PAKPLUS は HLA 抗体の有無にしか対応していないので、特異性別比較は不可能である。

MPHA 法のクロロキン処理では多少反応が認められたが明確な特異性はなく、また、PAKPLUS の血小板グリコプロテイン分画では全く反応がみられなかつたので、今回の 6 サンプルの血小板特異抗体は陰性と判断した。

### 3.4.3 LIFT (Lymphocyte Immunofluorescence Test) 法

LIFT 法は自家製パネル細胞の反応となるので一部特異性が抜けるが、検出感度は LAT と同等と考えられる。ただし、LIFT 法の場合実施する施設によってプロトコールが一定していない現状がある。細胞の状態、細胞固定のタイミング、標識 MoAb の使い方、反応温度・時間、測定機器、データ取込条件等まちまちであり検出感度としては他法より幅があると考えられる。

### 3.4.4 HLA 精製抗原検査試薬関連

LAT, FlowPRA, LABScreen は基本的に使用されている抽出抗原ソースは同一であるが、組み合わせで多少異なる。これらは市販試薬でありそれぞれ Screening, Specific, Single antigen タイプのパネル形態が揃っている。

テラサキプレートを用いて ELISA 法で行う LAT はポリスチレン・ビーズを用いてフローサイトメトリックに測定する他の 2 法に比べ抗体特異性検出感度はやや低い。LAT は検体希釈率に誤解があり、プ

ロトコールにある 1:2 は 2 倍希釈、1:3 は 3 倍希釈が正しい。LAT Specific で 1:3 を 4 倍希釈した施設で一部検出できていない。また、目視判定で擬陰性、擬陽性が生じた例も認められた。

全ての検査方法のなかで最も検出感度が高いのは FlowPRA と LABScreen である。測定方法とスコア計算方法が異なり結果として FlowPRA の方が鋭敏な印象を受ける。操作の簡便性は LABScreen が圧倒的に優れているが、一部の血清で特定のビーズに対し非特異反応が観察される。FlowPRA は通常のフローサイトメーターで測定できるが正確なデータ取込設定が要求され、一方 LABScreen は専用の測定装置を必要とする反面やっかいな機器設定はほとんどない。それぞれ含まれる抗原種類は血清学レベルでは満たされているが、抗体特異性同定において Single antigen タイプのアリルレベルではまだ不十分な面がある。(表 6)

FlowPRA Screening ではヒストグラムのパターン解析で次のような幾つかの誤判定が認められた。  
① Optimization か Region の設定が不適切なためヒストグラム上でテーリング反応が擬似的に認められ陽性と判定した。② ヒストグラム上の微小ピークを見逃したために陰性と判定した。③ ピークが崩れた形を呈し保留あるいは陽性と判定した。④ 誤判定につながっていないが同一サンプル・複数の施設で異なったテーリング形状を示していた。洗浄操作の差かサンプルの非特異反応か原因不明である。

同じく FlowPRA Screening の %PRA 値を施設別・機種別に比較した。クラス I (IgG) において、SH1703, 1704 など反応の弱い抗体サンプルで施設別に大きなバラつきが認められた。クラス II (IgG) では問題なかった。IgM ではクラス I・II とも特定の機種で反応が不安定であった。もともと 2 次抗体のメーカーは機種ごとに一定していないので、洗浄操作か機器構造に起因する差か不明である。

LABScreen は機器設定による差はほとんどないで、試薬ロットとコントロール血清あるいはビーズ固有の非特異反応が結果を左右していると考えられる。① LABScreen Mixed (Screening) のクラス I (IgG) では試薬ロットが 3 種類混在し最新ロットだけが陽性カットオフ値を僅かに上回り陽性と判定さ

表 6 検査方法別の HLA 抗体特異性比較

れた。このロットのみビーズ番号と結合しているパネル抗原の組み合わせが異なり、ビーズ非特異反応の可能性がある。② 使用した陰性コントロールのロットで特定のビーズとの反応が異なり、結果として陽性と判定された。③ ロットは異なるがパネル構成、ビーズ構成は他と同一でありながら陰性のところ陽性と判定した。洗浄など操作上の問題が考えられる。④ 技術的問題ではないが、指定したカットオフ値と異なった値での誤判定が一例と判定結果の記入ミスが一例あった。

以上、FlowPRA や LABScreen は高感度であるがゆえに、操作方法、機器設定、試薬管理、データ解析を厳密に行わないとデータの再現性は確実に損なわれるということを今回の QC データは示している。

また、全体的に IgM を 2 次抗体とした場合の結果が不安定であり 2 次抗体の種類、洗浄操作、反応温度で何らかの影響を受けていると考えられる。市販

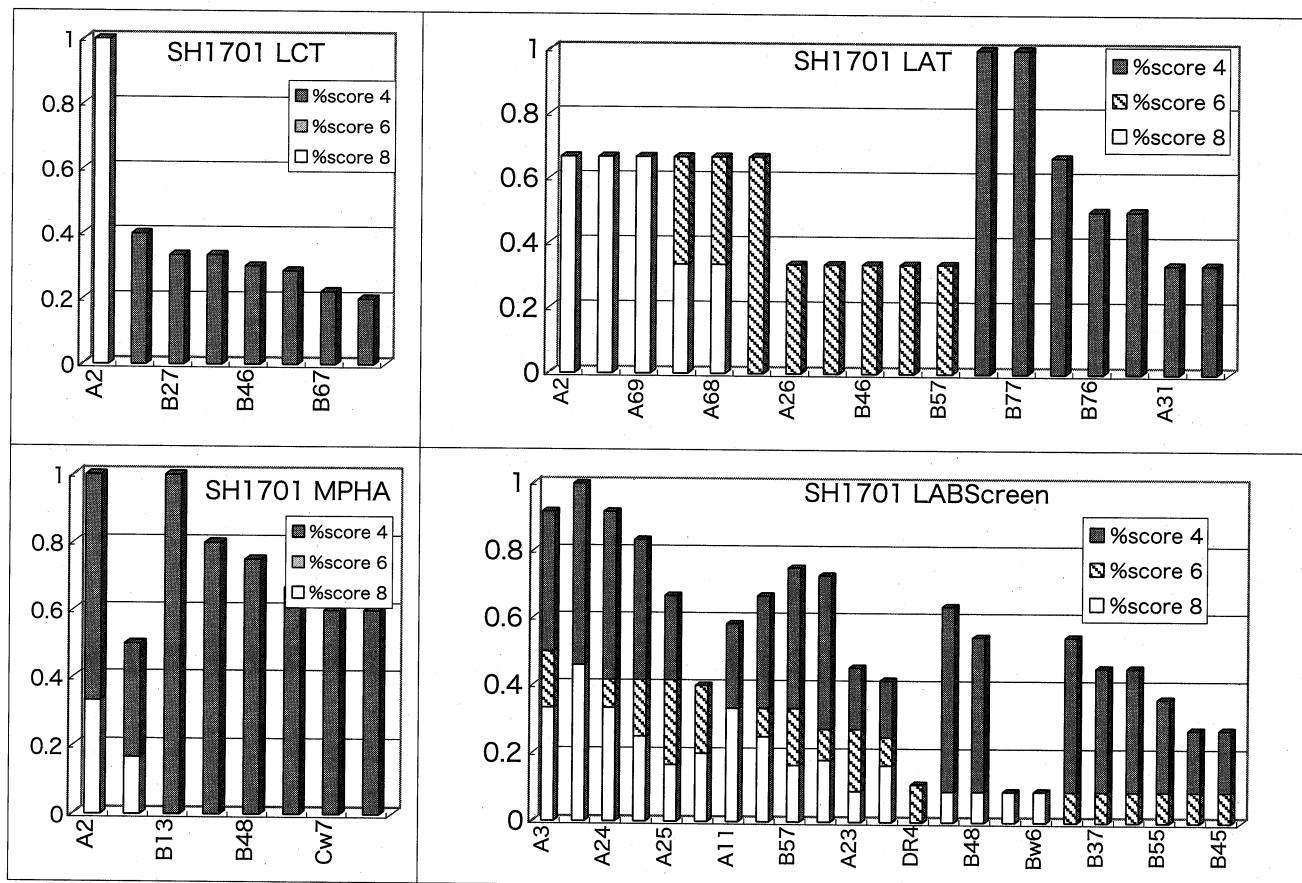
試薬は元来 IgM 抗体を考慮していない場合が多く、コントロールとの反応など IgG の条件設定でマッチしない部分が存在し不安定な結果につながったと考えられる。

### 3.5 判定スコアの導入とその解析

今回、各種検査方法や検査施設を越えて同一の次元で評価可能な方法として「判定スコア」の導入を試みた。従来のデータはパネル単位の反応状態を数値化(スコア化)した手法で解析してきたが、判定スコアは抗原単位で数値化する手法である。したがって、検査方法単位や施設単位などまとまった反応からスコア化することになる。

考え方は、陽性反応が確定した抗原をスコア 8 (6), 陰性反応が確定した抗原をスコア 1, 反応が確定していない抗原がスコア 4, 反応に含まれていない抗原がスコア 0 と判定する。

検査結果入力シートに判定スコア入力枠を設けた



グラフ 3 検査方法別の判定スコア(サンプル: SH1701)

表7 クロスマッチと血清学タイピングで確認できた HLA 抗原

DNA QC-ID	HLAクラスI						HLAクラスII					
	A*		B*		Cw*		DRB1*		DRB		DQB1*	
H1701	2403	1101	1502	5502	0801	1203	1405	1501	3*0202	5*0101	0503	0601
	A2403	A11	B75	B55	Cw8							
H1702	0203	2901	0705	1519	0403	1505	1001	1502	5*0102	-	0501	0502
	A203	A29	B7	B76	Cw4		DR10					
H1703	0204	-	5101	-	1502	-	1602	-	5*0202	-	0301	-
	A2		B51		Cw15							
H1704	0216	0301	5101	-	0704	1502	1104	1201	3*0202	-	0301	-
	A2	A3	B51		Cw7	Cw15						
H1705	0201	-	1801	-	0701	-	1201	-	3*0202	-	0301	-
	A2		B18		Cw7		DR12					
H1706	2402	-	0702	-	0702	-	0101	-	-	-	0501	-
	A24		B7		Cw7		DR1					

が、考え方方が十分浸透していなかったようで確実な集計・解析に至らなかった。提出されたデータを無駄にしないために、検査方法別に抗原単位で判定スコア値の頻度を求め高スコア順にソートしたグラフを例として示す。高感度法に向かうほど確定した抗原が増えていることが容易に読み取れる。これは検査方法別であるが、データのくくり方によってはさまざまな解析が期待できる。(グラフ3)

問題点は測定データ(スコア)から判定スコア化するプロセス、ルールが参加施設に確実に浸透していない点と、いわゆる反応の長い抗体特異性は判定スコアの多くが4になることが予測される点で、これらについて対応策を講じて次回に望みたい。

#### 4. DNA 部門と抗体部門の連携

HLA・QC ワークショップはタイピングを中心として9回目になるが、今回から抗体部門が新設されたことから、双方の連携を企画した。

DNA 部門のサンプルは EBV 株化 B リンパ芽球様細胞から DNA を抽出している。その細胞を培養して、抗体部門のサンプルであるヒト由来 HLA 抗血清との反応を測定し、DNA 部門で解析された HLA 遺伝子型に対応した HLA 抗原の存在を確認することを目的とした。なおこの企画は東京医科歯科大学難治疾患研究所、神奈川県赤十字血液センター、東京都赤十字血液センター、日本赤十字社中

央血液研究所の協力のもと実施された。

方法は双方の反応(クロスマッチ)は LCT 法と LIFT 法を行った。また、生細胞があるので LCT 法 血清学タイピングも行った。データの詳細は省略するが、確認できた抗原を表に示す。(表7)

これによって、DNA 部門で使用した細胞の HLA クラス I 抗原のほとんどとクラス II 抗原の一部を検出できた。そして、DNA 部門のアリルタイピングの結果と抗原との対応に相違がないことを確認できた。

#### 5. まとめ

今回は極めて多彩に富んでいるサンプルを配布することができた(というより、行ってみて多彩な内容であることが判ったといった方が正しい)。これにより、通常使われている検査試薬の特徴を十分探ることができた。データの入力方法についてはなお改善が必要であり、データ提出方法のマニュアルなども必要と考える。また、集まったデータのリアサインを実施してより正確な集計・解析へと持っていくべきと考えている。今後、QC という枠を越えた部分の話になるかもしれないが、臨床成績との関連付けを企画していくことも重要である。本稿は各施設から提出された多数のデータから作成しており、誌面の関係で全てを示すことが不可能である。学会ホームページに詳細データを掲載予定であるのでそちらを参照されたい。

# 第9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—

木村彰方<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>10)</sup>, 太田正穂<sup>3)</sup>, 柏瀬貢一<sup>4)</sup>, 小林 賢<sup>5)</sup>, 酒巻建夫<sup>6)</sup>,  
佐田正晴<sup>7)</sup>, 田中秀則<sup>4)</sup>, 中島文明<sup>8)</sup>, 成瀬妙子<sup>9)</sup>, 丸屋悦子<sup>10)</sup>, 安波道郎<sup>1,2)</sup>

(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. はじめに

日本組織適合性学会では、DNA タイピング結果および HLA 型 (HLA 抗原型)の表記は、HLA 標準化委員会から示されている「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)」(以下、表記法)に従って行なうこととしており、QC ワークショップにおける結果報告についても、この表記法に従って結果表記する必要がある。ここでは、今回の HLA-QC ワークショップにおける各施設から報告された結果を基に、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

### 2.1 結果の集計

結果の集計を行うため、以下の内容について提出された結果の表記を変更した。ローカス名がある場合とない場合があるため、今回は削除して集計した。アリルを意味する "\*" (アステリスク)についても、記載された結果とされない結果があるため、今回は削除して集計を行なった。結果表記法では、「アリルが 1 つしか検出されなかった場合は、後ろのカラムに “-” (ハイフン)を記載すること」とされているが、提出されたデータでは、空欄と “—” が混在していることから、空欄に統一して集計を行なった。判定不能、判定不可は、N.D.とした。DNA 型が未入力で、HLA 型にだけ入力されていた DNA 型を未入

力として集計した。2 つのカラムに同じアリルを記載することは、表記法では間違っており、正しくは「一方のカラムに結果を記載し、他方(後ろ)のカラムに “-” (ハイフン)を入力する」表記である。しかし、今回は集計のために、一方を空欄として処理した。以上の内容で、提出された結果の変更(修正)を行い、ローカスごとに集計を行なった。表記法に従っていない表記および QC ワークショップのデータとして相応しくない表記については、表中に網掛けで示した(表 1~6)

### 2.2 アリル表記の問題点

#### ① HLA 型(抗原型)での表記

DNA タイピング結果のアリル表記を、HLA 型で表記した例(例: B\*62, B\*75, DRB1\*7)が見られた。2 術レベルのタイピングキットを使用した結果を HLA 型に変換し、結果を記載したと思われる。HLA 型が、B62 および B75 であれば、B\*15 のアリルを結果に表記する必要があり、表記する内容はタイピングレベルに応じ「アンビギュイティ (ambiguity) の取扱いについて」に従って行なう必要がある。

#### ② “/” (スラッシュ)によるアリルの表記

例として、DRB1\*07, DRB1\*11 など 2 術による結果の表記が見られたが、2 術レベル(粗分別, low resolution)でタイピングを行なった結果を記載していると思われる。表記法において「2 術レベル(粗分別, low resolution)でタイピングを実施した場合は、

表1 HLA-A ローカス表記の集計

Sample :H1701				
Allele:A*1101		Allele:A*2403		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	11	9	1	24
2	1101	5	2	2402/03/04
3	1101/02	2	3	2402/03/04/+
4	1101/02/03/+	24	4	2403
5	1101/02/07	1	5	2403/10
6	1101/02/07/+	4	6	2403/10/22/+
7	1101/03/04/+	2	7	2403/10/23/+
8	1101/03/05/+	1	8	2403/10/33
9	1101/04	3	9	2403/10/33/+
10	1101/04/05/+	4	10	2403/22
11	1101/04/05/+	1	11	2403/22/23/+
12	1101/05/07/+	1	12	2403/33
13	110101	2	13	240301
14	N.T.	3	14	N.T.
15	未入力	2	15	未入力

Sample :H1702				
Allele:A*0203		Allele:A*2901		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	02	7	1	29
2	0201/02/03/+	8	2	2901
3	0203	40	3	2901/02/+
4	020301	4	4	2901/02/03/+
5	N.T.	3	5	2901/02/04
6	未入力	2	6	2901/02/04/
			7	2901/02/04/+
			8	2901/02/06
			9	290101
			10	29010101
			11	2907
			12	N.T.または-
			13	未入力

Sample :H1703				
Allele:A*0204		blankまたは-		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	02	9	1	blankまたは-
2	0201/02/03/+	7	2	0204
3	0201/04	1	3	?
4	0201/04/07/+	2	4	N.T.
5	0201/07	1	5	未入力
6	0201/07/+	1		
7	0201/07/09/+	1		
8	0204	13		
9	0204/17	20		
10	0204/17/58/+	2		
11	0204/33/58	1		
12	N.T.	4		
13	未入力	2		

Sample :H1704				
Allele:A*0216		Allele:A*0301		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	02	7	1	03
2	0201/02/03/+	7	2	0301
3	0201/07/18/+	1	3	0301/01N/11N/+
4	0201/09/11/+	2	4	0301/02/03/+
5	0215	1	5	0301/03/04/+
6	0216	39	6	0301/03N/04/+
7	2301/02/03/+	1	7	0301/03N/04/+
8	N.T.	4	8	0301/04
9	未入力	2	9	0301/04/07/+
			10	0301/04/11/+
			11	030101
			12	03010101
			13	0308
			14	N.T.
			15	未入力

Sample :H1705				
Allele:A*0101		blankまたは-		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	02	7	1	blankまたは-
2	0201	2	2	2404
3	0201/01L/04/+	2	3	?
4	0201/02/03/+	1	4	N.D.
5	0201/04/07/+	9	5	N.T.
6	0201/04/09/+	7	6	未入力
7	0201/07	1		
8	0201/07/+	1		
9	0201/07/09/+	9		
10	0201/07/15/+	2		
11	0201/07/15N	1		
12	0201/09/11/+	1		
13	020101	5		
14	02010101	1		
15	0204/17	1		
16	N.D.	2		
17	N.T.	11		
18	未入力	1		

Sample :H1706				
Allele:A*240201		blankまたは-		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	24	7	1	blankまたは-
2	2402	3	2	?
3	2402/03/05/+	5	3	N.D.
4	2402/05/07/+	3	4	N.T.
5	2402/05/09/+	7	5	未入力
6	2402/05/09N/+	3		
7	2402/05/11N/+	1		
8	2402/07/09/+	1		
9	2402/07/09N/+	1		
10	2402/09/11/+	8		
11	2402/09/20/+	1		
12	2402/09N/+	1		
13	2402/09N/11N/+	1		
14	2402/20	2		
15	2402/32/34/+	1		
16	240201	3		
17	24020101	1		
18	N.D.	3		
19	N.T.	11		
20	未入力	1		

表2 HLA-B ローカス表記の集計

Sample :H1701				
Allele:B*1502		Allele:B*5502		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	15	5	1 55	9
2	1502	46	2 5501/02/05	3
3	1502/13/31	2	3 5501/02/05/+	16
4	1502/88	6	4 5501/02/07	4
5	75	1	5 5502	12
6	N.T.	3	6 5502/01/05/+	1
7	未入力	2	7 5502/04	1
		8 5502/07/12		2
		9 5502/07/12/+		1
		10 5502/12		2
		11 5502/12/13		2
		12 5502/12/13/+		3
		13 5502/16		4
		14 N.T.		3
		15 未入力		2

Sample :H1702				
Allele:B*0705		Allele:B*1519		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	07	9	1 15	6
2	0702/04/07/+	1	2 1501	1
3	0702/05	1	3 1501/04/07/+	2
4	0705	3	4 1501/04/12/+	2
5	0705/06	39	5 1501/12/14/+	5
6	0705/06/09	1	6 1501/12/19/+	3
7	0705/06/09/+	5	7 1501/4805/+	1
8	0705/1576/+	1	8 150101	1
9	N.T.	3	9 1512	1
10	未入力	2	10 1512/14/19	6
		11 1512/19		24
		12 1519		6
		13 62		1
		14 B1501/04/07/+		1
		15 N.T.		3
		16 未入力		2

Sample :H1703				
Allele:B*510101		blankまたは-		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	51	9	1 blankまたは-	56
2	5101	6	2 18	1
3	5101/02/03/+	11	3 5301/02/03/+	1
4	5101/03/07/+	5	4 ?	1
5	5101/03/09/+	5	5 N.T.	4
6	5101/07/09/+	1	6 未入力	2
7	5101/09/11/+	9		
8	5101/09/11N/+	2		
9	5101/11/12/+	2		
10	5101/11N/12/+	1		
11	5101/11N/24/+	1		
12	5101/28/30/+	1		
13	510101	6		
14	N.T.	4		
15	未入力	2		

Sample :H1704				
Allele:B*510101		blankまたは-		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	51	9	1 blankまたは-	59
2	5101	5	2 ?	1
3	5101/02/03/+	12	3 N.T.	3
4	5101/03/07/+	5	4 未入力	2
5	5101/03/09/+	5		
6	5101/03/30	1		
7	5101/07/09/+	1		
8	5101/09/11/+	9		
9	5101/09/11N/+	2		
10	5101/11/12/+	2		
11	5101/11N/12/+	1		
12	5101/11N/24/+	1		
13	5101/28/30/+	1		
14	510101	6		
15	N.T.	3		
16	未入力	2		

Sample :H1705				
Allele:B*180101		blankまたは-		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	18	7	1 blankまたは-	50
2	1801	5	2 ?	1
3	1801/02/03/+	5	3 N.D.	1
4	1801/02/05/+	4	4 N.T.	12
5	1801/03/05/+	23	5 未入力	1
6	1801/05/06/+	1		
7	1801/05/11/+	2		
8	1801/17	1		
9	1801/17N	2		
10	180101	1		
11	N.D.	1		
12	N.T.	12		
13	未入力	1		

Sample :H1706				
Allele:B*070201		blankまたは-		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	07	8	1 blankまたは-	49
2	0702	3	2 N.D.	2
3	0702/03/07/+	1	3 N.T.	13
4	0702/03/10/+	9	4 未入力	1
5	0702/04/09+	1		
6	0702/04/09/+	2		
7	0702/09/10/+	2		
8	0702/10/15/+	3		
9	0702/10/18/+	1		
10	0702/10/21/+	1		
11	0702/15/21/+	4		
12	0702/21/22/+	9		
13	070201	4		
14	07021/022/023	1		
15	N.D.	2		
16	N.T.	13		
17	未入力	1		

表3 HLA-C ローカス表記の集計

Sample :H1701				
Allele:Cw*080101		Allele:Cw*120301		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	blankまたは-	1	1 06/12	1
2	08	5	2 0805	1
3	0801	5	3 12	7
4	0801/02/03/+	4	4 12/14	1
5	0801/02/04/+	1	5 1202/03/04/+	3
6	0801/03/04/+	3	6 1202/03/04/+、1404	1
7	0801/03/09	1	7 1203	3
8	0801/04/08	1	8 1203/04/05/+	1
9	0801/08	9	9 1203/06	1
10	080101	2	10 1203/06/07	6
11	0808	1	11 1203/06/07/+	4
12	8	2	12 1203/06/11	3
13	N.D.	1	13 120301	4
14	N.T.	28	14 N.T.	28

Sample :H1702				
Allele:Cw*0403		Allele:Cw*1505		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	04	3	1 0314	1
2	0401/02/03/+	2	2 15	6
3	0401/03/04/+	4	3 1502/03/05/+	2
4	0401/09/11/+	1	4 1502/05	1
5	0403	18	5 1502/05/08/+	1
6	0403/06	5	6 1502/05/09	1
7	4	3	7 1503	1
8	N.T.	28	8 1504/05/06/+	3
			9 1505	14
			10 1505/06	3
			11 1505/06/09	2
			12 1505/09	1
			13 N.T.	28

Sample :H1703				
Allele:Cw*150201		blankまたは-		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	15	8	1 blankまたは-	33
2	1502	2	2 03/15	1
3	1502/03	3	3 1502	1
4	1502/03/05	1	4 N.T.	29
5	1502/03/05/+	2		
6	1502/04/07/+	3		
7	1502/05	1		
8	1502/05/06/+	6		
9	1502/05/07/+	1		
10	1502/05/09	1		
11	1502/07/08	1		
12	1502/11	1		
13	1502/13	1		
14	150201	4		
15	N.T.	29		

Sample :H1704				
Allele:Cw*0704		Allele:Cw*150201		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	blankまたは-	1	1 0314	1
2	07	4	2 15	6
3	0704	2	3 1502	6
4	0704/11	7	4 1502/03	7
5	0704/11/12	18	5 1502/03/05/+	2
6	0704/11/12/+	1	6 1502/05	1
7	7	3	7 1502/05/06/+	3
8	N.T.	28	8 1502/05/08	1
			9 1502/05/09	1
			10 1502/07/08	1
			11 1502/07/08/+	1
			12 1502/11	2
			13 1502/13	1
			14 150201	3
			15 N.T.	28

Sample :H1705				
Allele:Cw*0701		blankまたは-		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	07	3	1 blankまたは-	25
2	0701	1	2 N.D.	2
3	0701/02/03/+	3	3 N.T.	37
4	0701/05/06	1		
5	0701/05/06/+	2		
6	0701/06	4		
7	0701/06/16	1		
8	0701/06/16+	1		
9	0701/06/16/+	2		
10	0701/06/18	1		
11	0701/06/18/+	6		
12	N.D.	2		
13	N.T.	37		

Sample :H1706				
Allele:Cw*070201		blankまたは-		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	07	2	1 blankまたは-	22
2	0701/02/03/+	5	2 ?	1
3	0702	3	3 N.D.	3
4	0702/03/05/+	3	4 N.T.	38
5	0702/05/08/+	3		
6	0702/05/13/+	3		
7	0702/08/10	1		
8	0702/10/17-+	1		
9	070201	1		
10	07020101	1		
11	N.D.	3		
12	N.T.	38		

表4 HLA-DRB1 ローカス表記の集計

Sample :H1701					
Allele:DRB1*140501		Allele:DRB1*150101			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	0317/1405/+	1	1	15	8
2	1152/1405	1	2	1501	14
3	14	8	3	1501/02	2
4	1401/02/05/+	4	4	1501/02/03/+	7
5	1402/03/05/+	2	5	1501/02/04/+	11
6	1402/05/06/+	2	6	1501/02/05/+	1
7	1405	20	7	1501/03/06/+	5
8	1405/08/14/+	7	8	1501/04/05/+	3
9	1405/08/23/+	1	9	1501/05	2
10	1405/08/34/+	1	10	1501/05/06/+	1
11	1405/08/43	1	11	1501/06/07/+	3
12	1405/08/45	2	12	1501/06/13	2
13	1405/14/23/+	1	13	150101	3
14	1405/23	1	14	15011	1
15	1405/37/43/+	1	15	未入力	2
16	1405/43	1			
17	1405/43/45	1			
18	1405/45	5			
19	140501	2			
20	N.T.	1			
21	未入力	2			

Sample :H1702					
Allele:DRB1*100101		Allele:DRB1*150201			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	blank	1	1	15	8
2	10	5	2	1501/02	3
3	1001	48	3	1501/02/03/+	6
4	100101	7	4	1501/02/04/+	10
5	100101/0102	1	5	1501/02/05/+	1
6	10011/012	1	6	1501/04/05/+	1
7	未入力	2	7	1502	17
			8	1502/02/03/+	1
			9	1502/03/06/+	1
			10	1502/06/11/+	1
			11	1502/08/11/+	2
			12	1502/08/14	1
			13	1502/11/14	3
			14	1502/14	1
			15	150201	7
			16	未入力	2

Sample :H1703					
Allele:DRB1*160201		blankまたは-			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	1504/1601/+	1	1	blankまたは-	53
2	16	6	2	/1511	1
3	1601/02/03	1	3	09012	1
4	1601/02/03/+	11	4	15	1
5	1601/02/05	1	5	1511/1602	2
6	1602	34	6	1602/05	1
7	1602/03/05	1	7	1605/07	2
8	1602/1360	1	8	?	1
9	160201	5	9	N.T.	1
10	16021	1	10	未入力	2
11	N.T.	1			
12	未入力	2			

Sample :H1704					
Allele:DRB1*110401		Allele:DRB1*120101			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	03/11/13/+	1	1	blankまたは-	3
2	03/11/14	1	2	1102/02/04/+	1
3	0301	1	3	12	7
4	11	7	4	1201	9
5	1101	2	5	1201(1206)	1
6	1101/	1	6	1201/02/03+	1
7	1101/02/03/+	1	7	1201/02/03/+	17
8	1101/02/04/+	3	8	1201/02/03/06/08/10	1
9	1101/04/06/+	6	9	1201/02/04/+	1
10	1101/04/12/+	2	10	1201/02/06	1
11	1101/12/15/+	1	11	1201/02/06/+	1
12	1101/1307	1	12	1201/04/05/+	3
13	1101/1307/+	1	13	1201/04/06/+	2
14	1101/15/24/+	1	14	1201/06	11
15	1103/1354/+	1	15	1201/08	1
16	1104	9	16	120101	1
17	1104/06	1	17	1202/03/06/+	1
18	1104/06/18	3	18	1306	1
19	1104/06/18/+	5	19	未入力	2
20	1104/06/18/43/44/47	1			
21	1104/06/25/+	2			
22	1104/16/25/+	1			
23	1104/18	1			
24	1104/18/43	1			
25	1104/35/38/+	1			
26	1104/43/46	3			
27	110401	3			
28	14	1			
29	N.D.	1			
30	未入力	2			

Sample :H1705					
Allele:DRB1*120101		blankまたは-			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	0804	1	blankまたは-	46	
2	12	6	0301	1	
3	1201	7	04/08/12	2	
4	1201(1206)	1	0825	1	
5	1201/02/03/+	8	0825/1201	1	
6	1201/02/06/+	1	1501/02	1	
7	1201/03/08	1	N.D.	1	
8	1201/04/05/+	2	N.T.	11	
9	1201/06	11	未入力	1	
10	1201/06/07	1			
11	1201/06/07/+	2			
12	1201/06/08	4			
13	1201/06/08/+	1			
14	1201/06/10	3			
15	1201/06/18/+	1			
16	1201/08/09	1			
17	120101	1			
18	N.D.	1			
19	N.T.	11			
20	未入力	1			

Sample :H1706					
Allele:DRB1*010101		blankまたは-			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	01	8	1	blankまたは-	49
2	0101	12	2	01/04	1
3	0101/02/04/+	15	3	01/0449	1
4	0101/04/05/+	2	4	N.D.	1
5	0101/05/07/+	1	5	N.T.	11
6	0101/07	3	6	undef	1
7	0101/08	20	7	未入力	1
8	0101/09/11	2			
9	010101	1			
10	N.D.	1			
11	N.T.	6			
12	未入力	1			

表5 HLA-DRB3/4/5 および DQA1 ローカス表記の集計

Sample :H1701					
Allele:DRB3*0202		Allele:DRB5*0101			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	DRB3	1	1	DRB5	1
2	DRB3*01	1	2	DRB5*01	4
3	DRB3*01/02/03	5	3	DRB5*01/02	5
4	DRB3*0101/02/03/+	2	4	DRB5*0101	6
5	DRB3*02	2	5	DRB5*0101/02/03/+	3
6	DRB3*02/03	1	6	DRB5*0101/05	2
7	DRB3*0201/02/03/+	1	7	DRB5*0101/05/09	3
8	DRB3*0201/02/03/+	6	8	DRB5*0101/05/09/+	5
9	DRB3*0201/0302/+	1	9	N.T.	33
10	DRB3*0202	6	10	未入力	2
11	DRB3*0202/01/03/+	1			
12	DRB3*0202/10/11/+	1			
13	DRB3*0202/12	1			
14	N.T.	33			
15	未入力	2			

Sample :H1702					
Allele:DRB5*0102		blankまたは-			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	DRB5	1	1	blankまたは-	26
2	DRB5*01	1	2	B3*0101	1
3	DRB5*01/02	8	3	N.T.	35
4	DRB5*0101/02/03/+	3	4	未入力	2
5	DRB5*0102	4			
6	DRB5*0102/0203/+	1			
7	DRB5*0102/03	1			
8	DRB5*0102/03/08	1			
9	DRB5*0102/03/08/+	5			
10	DRB5*0102/10	1			
11	DRB5*0103	1			
12	N.T.	35			
13	未入力	2			

Sample :H1703		Sample :H1704			
Allele:DRB5*0202		Allele:DRB3*0202			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	DRB5	1	1	DRB3	1
2	DRB5*01	1	2	DRB3*01	1
3	DRB5*01/02	8	3	DRB3*01/02/03	4
4	DRB5*0101/02/03/+	3	4	DRB3*0101/02/03/+	2
5	DRB5*0102/03/08/+	1	5	DRB3*02	2
6	DRB5*0110/0202/+	1	6	DRB3*0201/02/03/+	5
7	DRB5*02	2	7	DRB3*0202	7
8	DRB5*0202	3	8	DRB3*0202/01/03/+	1
9	DRB5*0202/03	1	9	DRB3*0202/03/04/+	1
10	DRB5*0202/03/04	1	10	DRB3*0202/10/11/+	2
11	DRB5*0202/03/04/+	1	11	DRB3*0202/12	1
12	DRB5*0202/04	6	12	N.D.	1
13	N.T.	33	13	N.T.	34
14	未入力	2	14	未入力	2

Sample :H1705			
Allele:DRB3*0202		Local Assignment	
	Local Assignment	件数	
1	DRB3	1	
2	DRB3*01/02/03	1	
3	DRB3*02	3	
4	DRB3*0201/02/03/+	7	
5	DRB3*0201/10/11/+	1	
6	DRB3*0202	4	
7	DRB3*0202/01/03/+	1	
8	DRB3*0202/10/11/+	1	
9	DRB3*0202/12	1	
10	N.D.	1	
11	N.T.	42	
12	未入力	1	

Sample :H1701					
Allele:DQA1*0102		blankまたは-			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	01	1	1	blankまたは-	4
2	0101/02/04	1	2	0104	1
3	0101/02/04/+	1	3	N.T.	59
4	0101/02/04/+	1			
5	0102	1			
6	N.T.	59			

Sample :H1702					
Allele:DQA1*0101		blankまたは-			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	01	1	1	blankまたは-	4
2	0101	1	2	0105	1
3	0101/02/04	1	3	N.T.	59
4	0101/02/04/+	1			
5	0101/02/04/+	1			
6	N.T.	59			

Sample :H1703					
Allele:DQA1*0501		blankまたは-			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	05	1	1	blankまたは-	4
2	0501	1	2	0401	1
3	0501/02/03+	1	3	N.T.	59
4	0501/03/05	1			
5	0505	1			
6	N.T.	59			

Sample :H1704					
Allele:DQA1*0501		blankまたは-			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	05	1	1	blankまたは-	4
2	0501	1	2	0401	1
3	0501/02/03+	1	3	N.T.	59
4	0501/03/05	1			
5	0505	1			
6	N.T.	59			

Sample :H1705					
Allele:DQA1*0501		blankまたは-			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	0501	1	1	blankまたは-	3
2	0501/02/03+	1	2	N.T.	61
3	0501/03/05	1			
4	N.T.	61			

Sample :H1706					
Allele:DQA1*0201		blankまたは-			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	0101/02/04	1	1	blankまたは-	3
2	0101/02/04+	1	2	N.T.	61
3	0101/02/04/+	1			
4	N.T.	61			

表6 HLA-DQB1 および DPB1 ローカス表記の集計

Sample :H1701			
Allele:DQB1*050301		Allele:DQB1*0601	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 05	3	1 06	3
2 05/01/02/03/+	1	2 0601	17
3 0501	1	3 0601/02/03/+	4
4 0501/02/03/+	4	4 0601/02/04/+	1
5 0503	14	5 0601/07/08+	1
6 050301	3	6 N.T.	36
7 N.T.	36	7 未入力	2
8 未入力	2		

Sample :H1702			
Allele:DQB1*0501		blankまたは-	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 05	3	1 blankまたは-	9
2 0501	15	2 0303	1
3 0501/02/03/+	5	3 0502	14
4 050101	2	4 050201	2
5 0503	1	5 N.T.	36
6 N.T.	36	6 未入力	2
7 未入力	2		

Sample :H1703			
Allele:DQB1*0301		blankまたは-	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 03	4	1 blankまたは-	25
2 0301	6	2 N.T.	37
3 0301/04/05/+	1	3 未入力	2
4 0301/04/09/+	6		
5 0301/09	2		
6 0301/09/13	5		
7 030101	1		
8 N.T.	37		
9 未入力	2		

Sample :H1704			
Allele:DQB1*0301		blankまたは-	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 03	4	1 blankまたは-	26
2 0301	6	2 N.T.	36
3 0301/04/05/+	1	3 未入力	2
4 0301/04/09/+	7		
5 0301/09	2		
6 0301/09/13	5		
7 030101	1		
8 N.T.	36		
9 未入力	2		

Sample :H1705			
Allele:DQB1*0301		blankまたは-	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 03	1	1 blankまたは-	15
2 0301	3	2 N.T.	48
3 0301/04/05/+	1	3 未入力	1
4 0301/04/09/+	1		
5 0301/09	2		
6 0301/09/13	6		
7 030101	1		
8 N.T.	48		
9 未入力	1		

Sample :H1706			
Allele:DQB1*0501		blankまたは-	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 05	5	1 blankまたは-	15
2 0501	8	2 N.T.	48
3 0501/02/03/+	4	3 未入力	1
4 050101	1		
5 050102	7		
6 N.T.	1		
7 未入力	2		

Sample :H1701			
Allele:DPB1*0501		blankまたは-	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0501	4	1 blankまたは-	4
2 N.T.	60	2 N.T.	60

Sample :H1702			
Allele:DPB1*0201		Allele:DPB1*0301	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0201	2	1 0301	1
2 020102	1	2 0301/7801	1
3 57/70	1	3 030101	1
4 N.T.	60	4 57/70/84	1
		5 N.T.	60

Sample :H1703			
Allele:DPB1*0402		blankまたは-	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 04/77/82/94	1	1 blankまたは-	3
2 0402	2	2 04/77/82	1
3 0402/7701/8201/9401	1	3 N.T.	60
4 N.T.	60		

Sample :H1704			
Allele:DPB1*0201		Allele:DPB1*0402	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0201	3	1 04/77/82	1
2 020102	1	2 0402	2
3 N.T.	60	3 0402/7701/8201	1
		4 N.T.	60

Sample :H1705			
Allele:DPB1*0201		blankまたは-	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0201	1	1 blankまたは-	3
2 0201/9401	1	2 N.T.	61
3 020102	1		
4 N.T.	61		

Sample :H1706			
Allele:DPB1*0402		blankまたは-	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1 0402	2	1 blankまたは-	3
2 0402/7701/8201/9401	1	2 N.T.	61
3 N.T.	61		

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」とされている。そのためからか、2桁での結果の表記が多いのではないかと思われるが、試薬の特性を知ることからも「アンビギュイティ(ambiguity)の取扱いについて」に従い、区分できないアリルを“/”(スラッシュ)を用いて、表記することが好ましいと思われる。

③ “/”(スラッシュ)によるアリル記載法の間違い  
“/”(スラッシュ)を用いた区分不可能なアリルの表記として間違っていた例を以下に示す。3種類のアリルを記し、最後に“/+”とするところを、4種類以上のアリルを表記した例(DRB1\*1201/02/03/06/08/11)。区分不可能なアリルを2桁で表記するところを、3桁で表記した例(DRB1\*0101/021/04/+). 2種類のアリル表記“/+”を用いていた例(A\*0201/07/+), タイプされたアリルが2種類だけなら“/+”は不要となる。3種類のアリルを記し、最後に記載する“/”(スラッシュ)が抜けている例(DRB1\*0101/02/04N+ → DRB1\*0101/02/04/+).

#### ④ 5桁目以降の区分出来ないアリルの表記

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」とされており、5桁目以降の区分出来ないアリルがある場合は、4桁で表記するとなっている。そのため、B\*070201/022/023 および DRB1\*100101/0102 は、表記法では B\*0702 および DRB1\*1001 と表記することが正しい。また、新しい命名法では、同義置換のアリルを区分するために、5桁目以降の2桁を使用しているが、旧命名法(5桁以降の1桁で同義置換を区分)で表記している例(DRB1\*15011 等)が見られた。

#### ⑤ N(null) および L(low) の表記

表記法の「アンビギュイティ(ambiguity)の取扱い」では、区分出来ないアリルの表記は、最初アリルを4桁で、それ以降2桁で表記することになっており、nullを意味する“N”およびlow expressionを意味する“L”は、表記しない方が正しい(例: A\*0301/03N/04/+, B\*5101/11N/12/+, A\*0201/01L/04/+ 等の結果表記では、“N”または“L”を表記しない)。

#### ⑥ 判定不能、N.D., nd の表記

前回の QCWS 集会において、判定不能の場合の結果表記として、判定が出来なかったことを意味する undefined の略である、`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とされた。しかし、この表記法が未だに周知されていないようで、今回の QCWS では N.D. および判定不能が多く使われていた。また、“nd”の表記については、表記法で「判定されたアリルが一つで、それ以外に明らかに異なるアリルの存在が疑われるが、そのアリルが特定出来ない場合に、“nd”と記載しても良い」とされており、一部施設の結果に使用されていた。

#### ⑦ ( )または?付き表記

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“?”を付けた表記が見られた(例: DRB1\*1201(1206))。これらの場合、アンビギュイティを意味する“( )”または“?”であれば、表記法に従い、“/”を用いた表記をする必要がある。また、一方のアリルが特定出来ない場合であれば“nd”を、判定不能あれば“`undef`”を用いた結果表記が必要となる。

#### 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。HLA-DRB3, DRB4 および DRB5 遺伝子座の有無が確認出来るレベルでのタイピングを行なったことから、このような結果表記となったと思われるが、当然、区分不可能なアリルも含まれることから、それぞれ「アンビギュイティ(ambiguity)の取扱いについて」に従い、アリル表記をする必要がある。

#### ⑨ アリル未入力

アリル記載欄に何も結果表記をせずに、HLA型(抗原型)だけを表記した施設が一部に見られた。表記法において、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。」を参考にして「HLA

型」で結果表記をしたと思われるが、QCWS では DNA タイピングの結果に従いアリルを表記し、タイピング結果に従って対応する HLA 型を表記すべきである。

### 2.3 HLA 型の表記の問題点

HLA 型（DNA タイピング結果から推定される HLA 抗原型）の表記について、17 施設で HLA 型が表記されておらず、3 施設でアリル欄に表記が無く、HLA 型だけが表記されていた。QCWS では、DNA タイピングを行ない、対応する HLA 型との関係を理解するために、両方の表記を行なうようにしており、DNA タイピングの結果を十分に理解し、対応する HLA 型を決定することが必要となる。

HLA-A 座の HLA 型表記において、A\*2403 および A\*0203 については、対応する HLA 型が公認された A2403 および A203 であることから、A24, A2 という HLA 型の表記は厳密には間違いである。

HLA-B 座の HLA 型表記では、アリルが B\*15 と

表記されているにも関わらず、HLA 型は B75 や B62 と表記されている結果が多く見られた。B15 グループのアリルと HLA 型の関係は複雑であるが、少なくとも HLA 型を B75 または B62 と表記することが可能であるならば、アリル表記を B\*15 とすることは間違っており、これらの HLA 型が特定出来る DNA タイピング結果の記載が必要となる。

HLA-DRB1 座の HLA 型表記では、アリルが DRB1\*1502 または DRB1\*1602 と特定されているにも関わらず、DR2 と表記された例が見られた。それぞれ DR15 および DR16 と表記する必要があり、DRB1\*15 と \*16 が区分出来ない場合は、DR2 と表記する必要がある。

HLA-DRB3, DRB4, DRB5 座の HLA 型の表記では、遺伝子座に使われている数字 “3, 4, 5” を使った HLA 型の表記が数多く見られた。HLA-DRB3, DRB4, DRB5 はあくまでも遺伝子座であり、対応する HLA 型は、それぞれ DR52, DR53, DR51 であることを十分認識する必要がある。