

MHC

日本組織適合性学会誌

Major Histocompatibility Complex

Vol. 13 No. 3, 2007

Contents

日本組織適合性学会からのお知らせ

会告	165
第16回日本組織適合性学会大会のご案内	166
2006年度TFB学術奨励賞選考結果について	169
2007年度学術奨励賞の募集のお知らせ	170
第11回QCワークショップのご案内	172
平成19年度認定HLA検査技術者講習会のお知らせ	174
平成19年度認定HLA検査技術者認定試験申請要領	175
平成19年度認定組織適合性指導者資格認定試験申請要領	177
平成19年度認定組織適合性指導者および認定HLA検査技術者認定証更新申請要領	179
組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿	181
第5回日本組織適合性学会近畿地方会のご案内	182
訂正	184
第143回日本獣医学会学術集会・第3回動物MHCシンポジウムのご案内	185

[原著論文]

Somatic mutations leading to incomplete extinction of HLA class I were associated with replication error phenotype-positive colorectal carcinoma Tatsuhito Nouchi, Michio Yasunami, Ryuichi Mibu, Seigoh Yasunaga, Manatsu Itoh-Satoh, Megumi Takahashi, Shigefumi Tanaka, Hiroyuki Kuwano, and Akinori Kimura	187	
第10回HLA-QCワークショップレポート	木村彰方, 赤座達也, 太田正穂, 柏瀬貢一, 小林賢, 酒巻建夫, 佐田正晴, 田中秀則, 中島文明, 成瀬妙子, 丸屋悦子, 安波道郎	199
平成18年度HLA検査技術者認定試験に関する報告	太田正穂, 石川善英, 石谷昭子, 大橋順, 小河原悟, 柏瀬貢一, 木村彰方, 小林賢, 高原史郎, 田中秀則, 徳永勝士, 中島文明, 西村泰治, 平山謙二, 丸屋悦子, 屋部登志雄	255
平成18年度認定HLA検査技術者登録名簿	267	
日本組織適合性学会 平成17年度決算報告書	269	
〈日本組織適合性学会誌MHC投稿規定〉	271	
編集後記	273	

日本組織適合性学会誌 MHC 編集委員会

編集委員長

徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野

編集委員

間 陽子 理化学研究所分子ウイルス学研究ユニット
猪子 英俊 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門
大谷 文雄 北里大学医学部免疫学講座
木村 彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野
小林 賢 日本薬科大学生物化学研究室
中島 文明 日本赤十字社中央血液研究所研究開発部
成瀬 妙子 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野

編集協力者

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

● Contents ●

日本組織適合性学会誌 第13巻第3号 平成19年1月31日発行

日本組織適合性学会からのお知らせ

会告	165
第16回日本組織適合性学会大会のご案内	166
2006年度TFB学術奨励賞選考結果について	169
2007年度学術奨励賞の募集のお知らせ	170
第11回QCワークショップのご案内	172
平成19年度認定HLA検査技術者講習会のお知らせ	174
平成19年度認定HLA検査技術者認定試験申請要領	175
平成19年度認定組織適合性指導者資格認定試験申請要領	177
平成19年度認定組織適合性指導者および認定HLA検査技術者認定証更新申請要領	179
組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿	181
第5回日本組織適合性学会近畿地方会のご案内	182
訂正	184
第143回日本獣医学会学術集会・第3回動物MHCシンポジウムのご案内	185

[原著論文]

Somatic mutations leading to incomplete extinction of HLA class I were associated with replication error phenotype-positive colorectal carcinoma Tatsuhito Nouchi, Michio Yasunami, Ryuichi Mibu, Seigoh Yasunaga, Manatsu Itoh-Satoh, Megumi Takahashi, Shigefumi Tanaka, Hiroyuki Kuwano, and Akinori Kimura	187
第10回HLA-QCワークショップレポート 木村彰方, 赤座達也, 太田正穂, 柏瀬貢一, 小林賢, 酒巻建夫, 佐田正晴, 田中秀則, 中島文明, 成瀬妙子, 丸屋悦子, 安波道郎	199
平成18年度HLA検査技術者認定試験に関する報告 太田正穂, 石川善英, 石谷昭子, 大橋順, 小河原悟, 柏瀬貢一, 木村彰方, 小林賢, 高原史郎, 田中秀則, 徳永勝士, 中島文明, 西村泰治, 平山謙二, 丸屋悦子, 屋部登志雄	255
平成18年度認定HLA検査技術者登録名簿	267
日本組織適合性学会 平成17年度決算報告書	269
〈日本組織適合性学会誌MHC投稿規定〉	271
編集後記	273

日本組織適合性学会 会告

1. 新役員選挙結果について

日本組織適合性学会会則第11条、第12条に基づいて行われた役員選挙の結果、理事9名、監事2名が選出されました。また、会長が森島泰雄評議員を指名理事として推薦し、理事会において承認されました。なお、任期は平成18年9月25日から2年です。

2. 新役員人事について

平成18年9月に開催された理事会において、以下の新役員人事案が決議され、評議員会、並びに総会において承認されました。

理 事

氏 名	担 当
木村 彰方	会長, 学術奨励, 事務局
赤座 達也	会計, 会則, 標準化
猪子 英俊	渉外, 将来構想
佐治 博夫	標準化
佐田 正晴	認定制度
高原 史郎	編集
西村 泰治	教育
徳永 勝士	倫理
前田 平生	選挙
森島 泰雄 (指名理事)	渉外

監 事

氏 名	担 当
笹月 健彦	監事
十字 猛夫	監事

第 16 回 日本組織適合性学会大会のご案内

第 16 回 日本組織適合性学会大会
大会長 赤座 達也

早春の候、皆様には益々御清祥のこととお慶び申し上げます。

第 16 回日本組織適合性学会大会を下記の要領で開催致します。今大会は、「MHC と抗体の新時代—臨床への展開」をテーマとしますので、会員の皆様の多数のご参加をお待ち致しております。

会 期： 2007 年 9 月 9 日(日)～9 月 11 日(火)

会 場： ぱるるプラザ京都

京都市下京区東洞院通七条下ル東塩小路町 676 番 13 (京都駅北口東横)

TEL: 075-352-7444

大会内容(いずれも予定)

1. Terasaki シンポジウム 「エピトープによる抗体特異性解析の基礎と臨床応用」(仮題)
 - 1) 基調講演 P. I. Terasaki
 - 2) 報 告 基礎的検討・妊娠・輸血・移植における抗体のエピトープレベルの解析の試み
2. シンポジウム: 「移植における組織適合性モニタリング」(仮題)
3. ワークショップ: 「ようこそ組適塾へ!」: 移植医療の症例について、主治医からの質問を、会場の臨床医・研究者・検査担当者がクイックレスポンスで回答し集計した結果を表示します。それを司会者とコメンテーターが解説し、参加者と共に討論する新しい方式のワークショップを目指します。
4. 特別・教育講演: 2 題を予定
5. 一般演題・学術奨励賞発表
6. QC ワークショップ, 認定技術者講習会
7. ランチョンセミナー, その他

一般演題募集要項

1. 発表形式

発表者は全員ポスターを掲示していただきます。

発表形式(口演またはポスター発表)については、大会事務局にご一任願います。

演者は本学会員であることが必要です。

2. 申し込み方法

1) 抄録の形式

- 抄録は、MicrosoftWord の文書ファイルを用いて、和文、または英文にて作成願います。
- 1) 演題名, 2) 演者, 3) 所属, 4) 本文の順に記載し、発表者には○印を付けてください。
- 本文は 800 字以内とし、目的、方法、結果、考察等に分類して、具体的なデータとともに記載願います。英数字は半角文字を使用し、2 文字で 1 字とします。フォントは MS 明朝に統一願います。(事務局で統一的に変換する場合があります。あらかじめご承知ください)

2) 演題申し込み票ファイルの作成

抄録とは別ファイルにて作成願います。1) 演題名, 2) 演者, 3) 所属と, 4) 代表者の連絡先住所電話番号, FAX, e-mail アドレスを記載してください。

3) 申し込み受け付け

演題受付は, 原則として e-mail により行います。件名は「16JSHI 演題」として, 1) 抄録, 2) 演題申し込みファイルの2つのファイルを, 添付書類にて第16回大会事務局 (16jshi-jimu@hla.or.jp) までお送りください。

3. 演題申し込み締め切り

2007年4月28日(土)必着

4. 演題受領通知および採択通知

演題受付後7日以内に e-mail または FAX にて演題受領の通知を致します。演題発表の形式(口演またはポスター)および日時につきましては, 2007年7月上旬頃迄に e-mail または FAX にて通知を致します。

参加登録費

参加費は事前登録を行います。

	理事・評議員	会員・非会員
事前登録(2007年7月31日受付まで)	¥8,000	¥6,000
当日参加(2007年8月1日以降)	¥10,000	¥8,000

事前登録参加費は下記の銀行口座に振り込みをお願いします。入金確認後, 大会事務局より参加証の引き換え券を郵送致します。参加証(領収書兼用)は, 当日学会受け付けにてお渡し致します。なお, お振り込みの際には, お名前を, 複数の場合はその人数分の名前をご記入願います。

(振込先) UFJ 銀行 東松原支店

普通 口座番号 3746449

第16回日本組織適合性学会大会事務局 赤座達也

懇親会

2007年9月10日(月) 18:30より懇親会を開催致します。奮ってご参加ください。

宿泊・交通について

本大会の宿泊, 交通に関しましては, 各自ご手配願います。京都市内のホテルは混雑が予想されますので, お早めに予約されることをお勧め致します。

2007年度学術奨励賞の募集

第16回組織適合性学会大会に応募された一般演題の中から, 特に優秀と認められた演題の筆頭演者に学術奨励賞が授与されます。詳しくは本誌に記載されている「2007年度学術奨励賞の募集のお知らせ」をご参照下さい。

大会事務局

本大会に関するお問合せは、下記の大会事務局にお願いいたします。

〒606-8396 京都市左京区川端丸太町下ル下堤町 82

特定非営利活動法人 HLA 研究所

第 16 回日本組織適合性学会大会 事務局

Tel: 075-762-5201 FAX: 075-762-5202 E-Mail: 16jshi-jimu@hla.or.jp

その他

大会情報は今後の MHC 誌上、および日本組織適合性学会ホームページで随時更新いたします。

日本組織適合性学会 2006 年度学術奨励賞選考結果について

学術奨励賞選考委員会

委員長 木村 彰方

1. 2006 年度学術奨励賞の公募経緯

若手研究者の研究奨励と研究助成を目的として、2005 年度に日本組織適合性学会学術奨励賞が創設されたが、2006 年度より (1) 基礎研究系(主に基礎医学系の研究。理学, 生物学的な研究を含む), (2) 臨床研究系(臨床関連研究。基礎医学的な疾患研究などを含む), (3) 技術応用系(実務関連研究。実務を通じた発見, 技術応用などを含む)の 3 分野に分けて募集することとし, 第 15 回日本組織適合性学会大会に応募された一般演題の中から, 特に優秀と認められた演題の筆頭演者に与えられるものとした。応募資格は, 1) 筆頭演者は本学会の正会員であり, かつ 2004 年度までの会費を納入済であること, 2) 筆頭演者は 2005 年 9 月 26 日時点で満 45 才未満であること(ただし, 技術応用系は年齢制限なし), 3) 応募しようとする演題の内容において, 筆頭演者が中心的な役割を果たしていること, 4) 応募しようとする演題の内容が, 本学会にふさわしく, かつ未発表であることとした。

2. 選考経緯

学術奨励賞には, 5 月末日迄に 7 件(基礎研究系 1 件, 臨床研究系 3 件, 技術応用系 3 件)の応募があった。一般演題 31 題と合わせて, MHC 編集委員, 編集協力者による 5 段階評価を実施し, 21 名による評価および認定制度委員会よりの推薦を参考にして, 学術奨励賞選考委員会で以下の 3 名を選考した。いずれの演題とも, 評価点は全演題の上位 6 分の 1 に入っていた。

3. 選考結果

基礎系

氏名(所属): 平安 恒幸 (東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学)

演 題: LILRA3 遺伝子にみる東アジア特異的な自然淘汰

臨床系

氏名(所属): 大谷 仁志 (東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部バイオ情報学)

演 題: 家族性肥大型心筋症 (FHCM) の新しい原因遺伝子座は HLA 領域にマップされる

技術応用系

氏名(所属): 小川 貴裕 (湧永製薬(株) バイオ事業開発部)

演 題: PCR-PHFA 法と Luminex システムを応用した HLA 遺伝子解析技術の開発

4. 受賞講演

優秀賞演題は, 第 15 回日本組織適合性学会大会中の 9 月 26 日に, 学術奨励賞受賞者講演として発表された。

2007 年度 学術奨励賞募集のお知らせ

学術奨励賞選考委員会
委員長 木村 彰方

会員の皆様

2006 年度に引き続き研究助成を目的とした日本組織適合性学会学術奨励賞の募集を行います。以下の要領で募集しますので、奮って御応募下さい。

1. 助成内容

2007 年度学術集会大会に応募された一般演題の中から、特に優秀と認められた演題の筆頭演者に学術奨励賞を授与します。授与件数は若干件で、1 件につき 10 万円程度の助成金授与を予定しております。

2. 募集分野

- (1) 基礎研究系（主に基礎医学系の研究。理学，生物学的な研究を含む）
- (2) 臨床研究系（臨床関連研究。基礎医学的な疾患研究などを含む）
- (3) 技術応用系（実務関連研究。実務を通じた発見，技術応用などを含む）

3. 応募資格

助成金応募にあたっては、以下の条件のすべてを満たしていることが必要です。

- 1) 筆頭演者は本学会の正会員であり、かつ 2006 年度までの会費を納入済であること
- 2) 応募しようとする演題の内容において、筆頭演者が中心的な役割を果たしたこと
- 3) 応募しようとする演題の内容が、本学会にふさわしく、かつ未発表であること
- 4) 筆頭演者は 2007 年 9 月 11 日時点で満 45 才未満であること。ただし、技術応用系については年齢制限はありません。

4. 応募方法

大会の演題抄録募集とは別途の手続きで行いますので、以下の書類を次のアドレス宛にメール添付で送って下さい。(HLA 学会事務局, Email; jshijimu.tis@mri.tmd.ac.jp)

必要書類

1) 抄録

一般演題に応募した抄録

(Word 形式で保存し、ファイル名を応募者名抄録.doc {例; 木村彰方抄録.doc} とする。ただし、Word が使えない場合はテキスト形式で保存しファイル名を応募者名抄録.txt とする)

2) 応募ファイル

1 頁目に、演題名，演者(全員)，所属(全員)，応募分野(基礎研究系，臨床研究系，技術応用系のいずれかひとつ)，および応募者(筆頭演者)の連絡先住所，電話番号，FAX，e-mail アドレス，生年月日，年令を記入する。

2 頁目以降に、応募した研究の背景，研究の意義，応募の動機，日本組織適合性学会との関わり(これまでと今後の方針・希望など)を、それぞれ 300-400 字程度でまとめる。

(Word形式で保存し、ファイル名を応募者名申込.doc {例; 木村彰方申込.doc} とする。ただし、Wordが使えない場合はテキスト形式で保存しファイル名を応募者名申込.txt とする)

5. 応募締め切り

2007年4月28日(必着)

(5月中旬までに応募ファイル受領を連絡しますが、受領連絡がない場合は、学会事務局までお問い合わせください)

6. 選考および結果通知について

応募された演題についてMHC編集委員および編集協力者等が予備審査を行い、その結果を参考にして学術奨励賞選考委員会にて選考を行います。結果は、7月下旬頃までに応募者宛に通知致します。

7. 助成金の使途

使途について特に制限はありませんが、学術奨励賞であることの趣旨をご理解の上、適切に使用ください。なお、使途とその内訳を後述の報告書に記載するものとします。

8. 受賞者にかかる義務について

- 1) 受賞者は、第16回日本組織適合性学会大会(学術奨励賞受賞講演セッション)において発表を行って頂きます。
- 2) 受賞者は、助成が行われた研究課題についての報告書(様式は別途通知します)を学会宛に提出して頂きます。

9. 助成が行われた研究課題の成果発表について

研究課題の研究成果については、原著論文もしくは総説等の形式にて、学会誌MHCへの積極的な発表をお願いします。

10. 問い合わせ先

本件に関する問い合わせは学会事務局をお願いします。

日本組織適合性学会事務局

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野内

Tel; 03-5280-8054, Fax; 03-528-8055, Email; jshijimu.tis@mri.tmd.ac.jp

第 11 回 HLA-QC ワークショップのご案内

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

前回は引き続き認定制度委員会主催の QC ワークショップ (QCWS) を開催致しますので、下記の通り案内致します。前回と同様、DNA タイピング QC (DNA-QC) に加えて、抗体検査 QC (抗体 QC) を実施します。なお、参加者には後日送付致します同意誓約書に署名していただきますが、同意誓約書の提出がない場合には QC サンプルを送付出来ませんのでご注意ください。

記

1. スケジュール (すべて予定ですので、今後変更があり得ます)
平成 19 年 4 月中旬 DNA サンプル, 抗体サンプル配布 (原則として, ラボ単位で配布)
平成 19 年 6 月上旬 データ提出締切り (原則として, 電子媒体による)
平成 19 年 8 月上旬 解析結果送付 (原則として, ラボ単位で配布)
2. QC ワークショップ集会
平成 19 年 9 月 9 日 (日) 午後 第 16 回日本組織適合性学会 (京都) にて
3. 参加費 (QC ワークショップ集会のみの参加も同様)
認定制度との関連で、参加は原則として個人を対象とします。
QC ワークショップにかかる資料代等の実費として、一名 2,000 円を申し受けます。
DNA-QC, 抗体 QC のどちらか一方に参加、どちらにも参加、集会のみに参加のいずれも、参加費は同一です。
4. 参加申し込み (QC ワークショップ集会のみ参加する場合も同様に申し込んでください)
学会ホームページ QC ワークショップ部会の URL (<http://jshi.umin.ac.jp/QCWS/>) より申し込み様式をダウンロードし、必要事項を記入後、メール添付にて QC ワークショップ部会まで送付ください。なお、電子媒体の使用が困難な場合は、別紙用紙に必要事項を記入し、ファックスまたは郵送にてお送りください。参加費の払い込みをもって参加申し込みの完了と致しますので、参加費は以下の口座に振込んでください。原則として、振込の控えをもって領収書とさせていただきます。集会のみの参加の場合も同様です。参加申し込み (参加費払い込み) の期限は、平成 19 年 2 月 24 日 (金)とします。
5. 振込口座
郵便振替口座 00160-7-482142
組織適合技術者認定制度委員会
振替用紙の通信欄に、「第 11 回 QCWS 参加費」および参加者氏名を必ず記載してください。

第 11 回 HLA-QC ワークショップ参加申込書
 (QC ワークショップ集会のみ参加する場合も、同様に申し込んでください)

参加申し込み締め切り(参加費払い込みを含む)は平成 19 年 2 月 24 日(金)です。

申込書の送付先

電子メール使用の場合

Email アドレス: jshiqcws.tis@mri.tmd.ac.jp

郵送または Fax の場合

101-0062 千代田区神田駿河台 2-3-10

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野 木村彰方

Fax: 03-5280-8055

* * *

以下の通り、第 11 回 HLA-QC ワークショップに参加致します

1) 参加者

代表*	参加者氏名	参加内容&	所属施設・部署	E メールアドレス#

&; 参加する QCWS 内容の記号 (a; DNA-QC のみ, b; 抗体 QC のみ, c; どちらも, d; 集会のみ)のいずれかを記載してください

*; 参加者の代表(結果の問い合わせなどに対応される方に◎をつけてください)

#; 問い合わせや案内に用いますので、代表者のみの記入で結構です。

2) サンプル (DNA および抗体)の送付先(実際にサンプルを受取る方の氏名)

QC ワークショップ集会のみの参加の場合は記入不要です

住所(郵便番号): (〒 -)

施設名: _____

所属部署: _____

氏名: _____

E-mail: _____, 電話: _____

具体的な QCWS 実施方法, 結果記入方法, 結果返送方法の詳細等を今後検討し, 学会ホームページに掲載するとともに, 代表者宛に連絡します。

組織適合性検査技術者認定制度 平成 19 年度・認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ

組織適合性検査技術者認定制度委員会

委員長 佐田 正晴

組織適合性検査技術者認定制度委員会教育部会

部会長 西村 泰治

日 時：平成 19 年 9 月 9 日(日曜日) 16～18 時ごろの予定(詳細は次号ならびに学会ホームページにて御案内いたします。)

場 所：パルプラザ京都(京都市下京区東洞院通七条下ル東塩小路町, JR 京都駅前)

参加費：2,000 円(テキスト代を含む)

内 容：各講習とも質疑応答を含めて、35 分を予定しています。なお講習のタイトルは、今後、若干変更される可能性があります。

(1) 臓器移植と HLA—組織適合性検査と HLA 抗体—

佐藤 壯 先生 (札幌北楡病院・臨床検査科)

(2) 骨髄バンクにおける HLA 適合の考え方

加藤 和江 先生 (日本赤十字社 中央骨髄データセンター)

(3) 造血幹細胞移植の臨床

日野 雅之 先生 (大阪市立大学大学院医学研究科 血液病態診断学)

この講習会は、今後 HLA 検査技術者認定を取得、あるいは更新しようとする者を対象に実施されますが、それ以外の者であっても自由に参加することができます。受講希望者には、以下の申込書に必要事項を記入し、熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野宛に FAX (096-373-5314) で平成 19 年 7 月 31 日(月)までに送付してください。あるいは、E メールで件名を「HLA 講習会」とし、申込書の必要事項を書き込んで「midorifu@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp」宛に、上記締め切り日までに送信してください。テキストは、申込数に応じて作成し、申込者に優先して配布します。そのため当日の申し込み者については、テキストの配布を受けられない場合がありますことを、あらかじめご了承ください。なお参加費は平成 19 年 8 月 31 日(木)までに、指定の郵便振替口座(口座番号：00160-7-482142, 口座名称：組織適合性技術者認定制度委員会)に振込んでください。振替用紙の通信欄に、受講(予定)者の所属、氏名とともに、「平成 19 年度認定 HLA 検査技術者講習会受講料」と記載してください。参加費前納者には、事前に講習会資料を送付させていただきます。なお受講申し込みをされ参加費を振り込まれた方で、当日欠席された方には返金できませんことを御了承ください。

平成 19 年度・認定 HLA 検査技術者講習会 受講申込書

(書き込み可能な申込書を、学会ホームページからダウンロードできますので、そちらも御利用ください。)

FAX 送信先：096-373-5314, E メール送信先：midorifu@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp

氏 名：

所 属：

住 所：〒

電 話 番 号：

FAX 番 号：

E メールアドレス：

HLA 検査技術者認定取得予定 なし あり → 平成 年度を予定

平成 19 年度 認定 HLA 検査技術者認定試験申請要領

日本組織適合性学会
 会長 木村 彰方
 組織適合性技術者認定制度委員会
 委員長 佐田 正晴

認定 HLA 検査技術者及び認定組織適合性指導者認定制度規則(以下「規則」といいます。)に基づき認定 HLA 検査技術者資格認定試験を下記のように実施します。

平成 20 年度に受験を予定している人は、今年度までに講習会のみを受講しておく必要があります。また、平成 21 年度以降に受験を予定している人も講習会の受講は可能です。なお、講習会の詳細については本誌別頁に記載の「平成 19 年度認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ」をご覧ください。

1 申請資格: 認定 HLA 検査技術者の資格認定試験を申請する人は、申請の前年度までに次の各項の認定試験受験資格基準をすべてを備えていなければなりません。

- (1) 日本組織適合性学会(以下「学会」といいます。)の会員歴が通算して 3 年以上あること。
- (2) 組織適合性検査に関する業務経験が 3 年以上あること。
- (3) 5 年間で技術者履修課程に定められた講習の受講歴があること。
- (4) 5 年間で資格審査基準が 30 単位以上あること。但し、当学会の大会への参加が 5 単位以上含まれていなければなりません。

なお、(2)の業務とは、組織適合性に関する検査、研究および教育をいいます。

資格審査基準の詳細については、学会ホームページ <http://jshi.umin.ac.jp/certification/> をご覧ください。

2 申請書提出期限: 平成 19 年 4 月 13 日(金)までに到着するよう簡易書留で下記の事務局へ送付してください。

3 申請書送付先: 〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10
 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野内
 組織適合性技術者認定制度委員会事務局
 電話 03-5280-8054, ファックス 03-5280-8055

4 提出書類: (1) 認定 HLA 検査技術者認定申請書と別記様式第 1 および別記様式第 2 の 1 から 2 の 6
 (2) 申請料振り込み用紙の写し
 (3) 80 円切手を貼った返信用封筒(申請者へ送れるように住所・氏名などを記載しておいてください)

必要な申請書類は本誌に綴じ込められています。なお、別記様式第 2 の 5 の貼付用台紙には学会参加証等のコピーおよび講習会修了証を貼り付けてください。資格審査基準証明書(別記様式 2 の 1)の所属長署名・捺印はなくてもかまいません。

資格審査結果については、5月下旬以降にメールで通知する予定です。

申請書類のファイルは、学会のホームページ <http://jshi.umin.ac.jp/certification/> からダウンロードできます。

5 申請料: 15,000 円

振込先

郵便振替口座: 00160-7-482142

口座名義: 組織適合性認定制度委員会

郵便振替用紙の通信覧に、「技術者資格認定試験申請料」と記入し、その下に、「申請者名」を書き込んでください。

6 実技研修会: 実施日時・場所等は、申請者に希望場所・日時を調査した上で決定し、本人に通知します。

実技研修は、規則第9条2項により、全員が受講しなければなりません(QCWS参加歴の有無によらず、実技研修は必須です)。

実施日時としては、7月中の2ないし3日間(施設によって異なります)を予定しています。なお、開催都市は、東京と京都を予定しています。5月下旬頃、資格審査結果と同時に実施施設と日時についてのアンケートをメールでお送りいたします。

7 実技・筆記試験: 実技試験: 平成19年9月9日(日)時間未定

筆記試験: 平成19年9月9日(日)時間未定

会場: ばるるプラザ京都

(京都市下京区東洞院通七条下ル東塩小路町 676 番 13)

試験の日時および会場については本人に郵送で8月上旬ごろ通知する予定です。但し、実技試験は規則第9条4項により、QCワークショップの参加歴がある場合、免除されます。

平成 19 年度 認定組織適合性指導者資格認定試験申請要領

日本組織適合性学会
 会長 木村 彰方
 組織適合性技術者認定制度委員会
 委員長 佐田 正晴

認定 HLA 検査技術者及び認定組織適合性指導者認定制度規則(以下「規則」といいます。)に基づき認定組織適合性指導者資格認定試験を下記のように実施します。

平成 20 年度に受験を予定している人は、今年度までに講習会のみを受講しておく必要があります。また、平成 21 年度以降に受験を予定している人も講習会の受講は可能です。なお、認定組織適合性指導者講習会は、2009 年 9 月 10, 11 日に開催される第 16 回日本組織適合性学会大会(京都)の講演などの受講をもって代えます。詳細については本誌別頁に記載の「平成 19 年度認定組織適合性指導者講習会のお知らせ」をご覧ください。

1 申請資格: 認定組織適合性指導者の資格認定試験を申請する人は、申請の前年度までに次の各項の認定試験受験資格基準をすべてを備えていなければなりません。

- (1) 日本組織適合性学会(以下「学会」といいます。)の会員歴が通算して 7 年以上あること。
- (2) 組織適合性検査に関する業務経験が 7 年以上あること。
- (3) 5 年間で指導者履修課程に定められた講習の受講歴があること。
- (4) 5 年間で資格審査基準が 70 単位以上あること。但し、当学会の大会への参加が 10 単位以上含まれていなければなりません。

なお、(2)の業務とは、組織適合性に関する検査、研究および教育をいいます。

2 申請書提出期限: 平成 19 年 4 月 13 日(金)までに到着するよう簡易書留で下記の事務局へ送付すること。

3 申請書送付先: 〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10
 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野内
 組織適合性技術者認定制度委員会事務局
 電話 03-5280-8054, ファックス 03-5280-8055

4 提出書類: (1) 認定組織適合性指導者認定申請書と別記様式第 4 および別記様式 2 の 1 から 2 の 6
 (2) 申請料振り込み用紙の写し
 (3) 80 円切手を貼った返信用封筒(申請者へ送れるように住所・氏名などを記載しておいてください)

必要な申請書類は本誌に綴じ込められています。なお、別記様式第 2 の 5 の貼付用台紙には学会参加証等のコピーおよび講習会修了証を貼り付けてください。資格審査基準証明書(別記様式 2 の 1)の所属長署名・捺印はなくてもかまいません。

資格審査結果については、5 月下旬以降にメールで通知する予定です。

申請書類のファイルは、学会のホームページ <http://jshi.umin.ac.jp/certification/> からダウンロードできます。

5 申請料: 30,000 円

振込先

郵便振替口座: 00160-7-482142

口座名義: 組織適合性認定制度委員会

郵便振替用紙の通信覧に、「指導者資格認定試験申請料」と記入し、その下に、「申請者名」を書き込んでください。

6 試験: 試験: 平成 19 年 9 月 9 日(日)時間未定

会場: ぱるるプラザ京都

(京都市下京区東洞院通七条下ル東塩小路町 676 番 13)

試験内容, 日時, 会場については, 本人に郵送で 8 月上旬ごろ通知する予定です。

平成 19 年度 認定組織適合性指導者および認定 HLA 検査技術者認定証更新申請要領

日本組織適合性学会
 会長 木村 彰方
 組織適合性技術者認定制度委員会
 委員長 佐田 正晴

平成 14 年度(2002 年度)に認定を受けられた方は、来年度(平成 19 年度)に更新を迎えられます。下記の更新基準を満たしているかをご確認いただき、必要書類を提出して更新手続きを行ってください。

1 申請資格:

(認定 HLA 検査技術者)

- (1) 認定証の登録年度から 5 年間に資格審査基準が 30 単位以上あること。但し、当学会の大会への参加が 5 単位以上含まれていなければならない。
- (2) 認定証の有効期間満了前の 2 年間に技術者履修課程に定められた講習を 1 回以上受講していること。
- (3) 認定証の登録年度から 5 年間に学会が主催する QC ワークショップ集会への参加があること。

(認定組織適合性指導者)

- (1) 認定証の登録年度から 5 年間に更新資格審査基準が 70 単位以上あること。但し、日本組織適合性学会誌における原著論文、総説、または学会の大会における発表が 15 単位以上含まれていなければならない。また、原則として当学会の大会への参加が 15 単位以上含まれていなければならない。
- (2) 認定証の有効期間満了前の 2 年間に指導者履修課程に定められた講習会を 1 回以上受講していること。
- (3) 認定証の登録年度から 5 年間に学会が主催する QC ワークショップ集会への参加歴があること。更新資格審査基準の詳細については、学会ホームページ <http://jshi.umin.ac.jp/certification/> をご覧ください。

2 申請書提出期限: 平成 19 年 4 月 13 日(金)までに到着するよう簡易書留で下記の事務局へ送付してください。

3 申請書送付先: 〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10
 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野内
 組織適合性技術者認定制度委員会事務局
 電話 03-5280-8054, ファックス 03-5280-8055

4 提出書類: (1) 認定 HLA 検査技術者認定申請書と別記様式第 1 および別記様式第 2 の 1 から 2 の
 6
 (2) 申請料振り込み用紙の写し
 必要な申請書類は本誌に綴じ込められています。なお、別記様式第 2 の 5 の貼付用台紙には学会参加証等のコピーおよび講習会修了証を貼り付けてください。資格審査基準証

明書(別記様式2の1)の所属長署名・捺印はなくてもかまいません。
資格審査結果については、6月上旬以降に郵送で通知する予定です。
申請書類のファイルは、学会のホームページ <http://jshi.umin.ac.jp/certification/> からダウンロードできます。

- 5 申請料:** 認定 HLA 検査技術者 15,000 円
認定組織適合性指導者 30,000 円
振込先
郵便振替口座: 00160-7-482142
口座名義: 組織適合性認定制度委員会
郵便振替用紙の通信覧に、「認定 HLA 検査技術者登録更新料」または「認定組織適合性指導者登録更新料」と記入し、その下に、「申請者名」を必ず書き込んでください。
- 6 認定証交付:** 認定証の交付は、第 16 回大会の 2 日目(9 月 10 日)に大会事務局にて行います。大会当日に受け取れない方は、120 円切手を貼付した A4 用紙が入る封筒(申請者へ送れるように住所・氏名などを記載しておいてください)を同封してください。

平成19年度認定HLA検査技術者認定試験受験申請書

認定HLA検査技術者認定試験の受験を申請します。

※受験番号

平成 年 月 日申請

フリガナ		性別	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; text-align: center;"> <p>写真を貼付</p> <p>申請日前6ヵ月以内に撮影されたもので 大きさは4×3cm</p> <p>平成 年 月 日撮影</p> </div>	
受験者氏名	(印)	男・女		
生年月日	(歳)			
本籍地 (都道府県名)				
フリガナ				
現住所				
電話	()			
フリガナ				
勤務先名				
フリガナ				
勤務先住所				
電話	()	ファックス	()	
電子メール	@			

※受付日

※書類の不備

※受験の出欠

※合否判定

平成19年度認定HLA検査技術者認定試験受験票

※受験番号

フリガナ		性別	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; text-align: center;"> <p>写真を貼付</p> <p>申請日前6ヵ月以内に撮影されたもので 大きさは4×3cm</p> <p>平成 年 月 日撮影</p> </div>	
受験者氏名		男・女		
生年月日	(歳)			
本籍地 (都道府県名)				
フリガナ				
現住所				

注 太枠内の必要事項を楷書で記入すること。※欄は記入しないこと。

資格審査基準証明書

申請日：平成 年 月 日

申請者名			
生年月日	昭和	年	月 日
勤務先			
勤務先住所			
電話番号			
1 日本組織適合性学会会員歴	年	月加入	申請日までの会員歴通算 年
2 QCワークショップ参加歴			申請日までの参加歴通算 年
3 組織適合性関連業務歴 (内訳)			申請日までの業務歴通算 年
4 講習会参加歴	平成	年	月参加
5 総取得単位数			単位
(内訳)	原 著 論 文	単 位	
	著 書	単 位	
	学 会 発 表	単 位	
	学 会 参 加 会	単 位	
	講 習 会	単 位	
	QCワークショップ集会参加	単 位	
	実 技 研 修 会	単 位	
以上、相違ないことを証明します。			
平成 年 月 日			
申請者名			(印)

切り取り線

単位内訳書 (原著論文・総説)

申請者名

番号	著者名	題名	発表雑誌名	巻	ページ	発行年

単位内訳書 (著者・総説)

申請者名

番号	著者名	題名	本名	出版社名	ページ	発行年

貼 付 用 台 紙

(この用紙に学会参加証及び講習会参加証の写しを貼付してください。)

A large, empty rectangular box with a solid black border, intended for pasting copies of certificates. The box occupies most of the page's vertical space.

平成19年度認定組織適合性指導者認定試験受験申請書

認定組織適合性指導者認定試験の受験を申請します。

※受験番号

平成 年 月 日申請

フリガナ		性別	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; text-align: center;"> <p>写真を貼付</p> <p>申請日前6ヵ月以内に撮影されたもので大きさは4×3cm</p> <p>平成 年 月 日撮影</p> </div>
受験者氏名	(印)	男・女	
生年月日	(歳)		
本籍地 (都道府県名)			
フリガナ			
現住所			
電話	()		
フリガナ			
勤務先名			
フリガナ			
勤務先住所			
電話	()	ファックス	()
電子メール	@		

※受付日

※書類の不備

※受験の出欠

※合否判定

平成19年度認定組織適合性指導者認定試験受験票

※受験番号

フリガナ		性別	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; text-align: center;"> <p>写真を貼付</p> <p>申請日前6ヵ月以内に撮影されたもので大きさは4×3cm</p> <p>平成 年 月 日撮影</p> </div>
受験者氏名		男・女	
生年月日	(歳)		
本籍地 (都道府県名)			
フリガナ			
現住所			

注 太枠内の必要事項を楷書で記入すること。※欄は記入しないこと。

平成19年度認定HLA検査技術者認定更新申請書

認定HLA検査技術者の認定更新を申請いたします。

			平成 年 月 日申請
フリガナ		性別	<p>写真を貼付</p> <p>申請日前6ヵ月以内に撮影されたもので大きさは4×3cm</p> <p>平成 年 月 日撮影</p>
申請者氏名	Ⓜ	男・女	
生年月日	(歳)		
本籍地 (都道府県名)			
フリガナ			
現住所			
電話	()		
認定証番号			
発行年月日	平成 年 月 日		
フリガナ			
勤務先名			
フリガナ			
勤務先住所			
電話	()	ファックス	()
電子メール	@		

注 太枠内の必要事項を楷書で記入すること。※欄は記入しないこと。

※受付日

※書類の不備

※更新認定証番号・発行日

切り取り線

平成19年度認定組織適合性指導者認定更新申請書

認定組織適合性指導者の認定更新を申請いたします。

平成 年 月 日申請

フリガナ		性別	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; text-align: center;"> <p>写真を貼付</p> <p>申請日前6ヵ月以内に撮影されたもので 大きさは4×3cm</p> <p>平成 年 月 日撮影</p> </div>	
申請者氏名	(印)	男・女		
生年月日	(歳)			
本籍地 (都道府県名)				
フリガナ				
現住所				
電話	()			
認定証番号				
発行年月日	平成 年 月 日			
フリガナ				
勤務先名				
フリガナ				
勤務先住所				
電話	()	ファックス	()	
電子メール	@			

注 太枠内の必要事項を楷書で記入すること。※欄は記入しないこと。

※受付日	※書類の不備	※更新認定証番号・発行日

切り取り線

組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿 (2007)

組織適合性技術者認定制度委員会

委員 長： 佐田 正晴

副委員 長： 小林 賢

委 員： 赤座 達也, 石川 善英, 猪子 英俊, 太田 正穂, 木村 彰方, 酒巻 建夫, 佐治 博夫,
田中 秀則, 中島 文明, 成瀬 妙子, 西村 泰治, 徳永 勝士資格審査部会

部 会 長： 小林 賢

副部会長： 田中 秀則

部 員： 柏瀬 貢一, 中島 文明, 成瀬 妙子

教育部会

部 会 長： 西村 泰治

副部会長： 成瀬 妙子

部 員： 太田 正穂, 小河原 悟, 木村 彰方, 小林 賢, 酒巻 建夫, 佐治 博夫, 佐田 正晴,
徳永 勝士, 中島 文明, 平山 謙二, 丸屋 悦子試験問題検討部会

部 会 長： 太田 正穂

副部会長： 石川 善英

部 員： 石谷 昭子, 大橋 順, 小河原 悟, 柏瀬 貢一, 木村 彰方, 小林 賢, 高原 史郎,
田中 秀則, 徳永 勝士, 中島 文明, 西村 泰治, 平山 謙二, 丸屋 悦子, 屋部 登志雄QC ワークショップ部会

部 会 長： 木村 彰方

副 部 会 長： 成瀬 妙子

DNA 部 門 長： 酒巻 建夫

DNA 副部門長： 安波 道郎

抗 体 部 門 長： 赤座 達也

抗 体 副 部 門 長： 中島 文明

部 員： 太田 正穂, 柏瀬 貢一, 小林 賢, 斉藤 敏, 田中 秀則, 佐田 正晴, 丸屋 悦子

第5回組織適合性学会近畿地方会案内および演題募集

秋冷の候、皆様には益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。臨床とHLA学の実りのある融合を目指して発足した日本組織適合性学会近畿地方会も、今回で5回目を迎えることとなりました。つきましては、以下の要項で演題の募集を致しますので、奮ってのご応募をお待ちしております。

日 時： 平成19年2月3日(土)
場 所： 参天製薬株式会社本社(別紙参照) 阪急千里線下新庄下車
大阪市東淀川区下新庄3-9-19 TEL 06-6321-7000
(学会のお問い合わせ先 0798-45-6348 兵庫医大輸血部)
会 費： 正会員 2000円
学 生 1000円
世話人 3000円 全て懇親会費も含まれます。
演題〆切： 一般演題募集、平成18年11月10日～12月20日
(抄録プリントアウトおよび電子ファイル)

抄録〆切： 平成19年1月10日

抄録はA4用紙1枚に、添付の様式(抄録作成要領)を参考にご作成ください。

字体はMS明朝 サイズは12ポイント

図表がある場合は別途A4用紙1枚に添付して下さい。

抄録プリントアウト送付先

〒663-8501 西宮市武庫川町1-1

第5回日本組織適合性学会近畿地方会 当番世話人

兵庫医科大学輸血部 甲斐 俊朗 宛

TEL 0798-45-6348

送付して頂いた抄録は直接抄録集の印刷にまわしますのでプリントアウトした綺麗なものを郵送頂ければと存じます。また、確認のため作成された抄録を電子ファイルで送付して頂ければと存じます。

抄録電子ファイル送信先

『第5回日本組織適合性学会近畿地方会演題』という件名で、kai@hyo-med.ac.jp まで送付ください。

発表形式：原則的にはWindows Power Point (2000またはXPで動作するよう作成ください。やむを得ない場合にはMacのPower Pointでも可能ですが当日パソコン、アダプターを持参ください)で作成していただき、平成19年1月27日(土)までに上記のメールアドレス宛にご送付ください。

発表時間：討論を含めて10分程度を目安として下さい。

なお、第5回日本組織適合性学会・近畿地方会の一般演題以外のプログラムは、下記の通りですのでお知らせ致します。

9時30分受付開始

10時～11時 オープニングセミナー

1)『HLA-Fの膠原病、移植への応用に向けて』

石谷 昭子 (奈良県立医科大学法医学教室)

2) 『HLA 抗体と造血幹細胞移植』

丸屋 悦子 (NPO 法人 HLA 研究所)

3) 『好中球, 単球, T/B リンパ球, 血小板を対象とした免疫蛍光抗体法 (5-cell lineage IFT) を用いた白血球抗体の検出』

松山 宣樹 (大阪府赤十字血液センター)

11 時～12 時 一般演題 (1)

12 時～13 時 昼食・世話人会

13 時～13 時 15 分 総会

13 時 15 分～14 時 15 分 一般演題 (2)

14 時 20 分～16 時 40 分

シンポジウム『HLA 不適合造血幹細胞移植』

——HLA 適合血縁 / 非血縁ドナーがない場合の選択——

座長: 椿 和央, 佐治 博夫

1) HLA 不一致非血縁者間骨髓移植——JMDP での成績から——

一戸 辰夫 (京都大学 血液・腫瘍内科)

2) IPA/NIMA 移植の利点と課題

島崎 千尋 (京都府立医科大学 血液内科)

魚嶋 伸彦 (松下記念病院血液科)

3) T 細胞非除去 HLA2-3 抗原不適合移植

小川 啓恭 (兵庫医科大学 血液内科)

4) HLA 非適合非血縁者間臍帯血移植

長村登紀子 (東京大学医科学研究所 セルプロセッシング・輸血部)

5) HLA 抗体と臍帯血移植

荒木 延夫 (兵庫県赤十字血液センター)

16 時 50 分～17 時 50 分

特別講演 『NK 細胞と造血幹細胞移植』

田中淳司 (北海道大学血液内科)

座長: 甲斐 俊朗

18 時～ 懇親会

以上

訂 正

MHC vol. 13 No. 2, 2006 の表紙および Contents に誤植がありましたので，以下のように訂正致します。関係各位にご迷惑をおかけしましたことをお詫びします。(MHC 編集委員会)

認定組織適合性指導者および認定 HLA 検査記述者認定証の更新について (誤)

認定組織適合性指導者および認定 HLA 検査技術者認定証の更新について (正)

以上

第 143 回日本獣医学会学術集会
第 3 回動物 MHC シンポジウム

主要組織適合抗原と疾患解析の最前線

——臨床応用への展望——

日 時: 2007 年 4 月 5 日(木) 9:00~12:00
場 所: つくばカピオホール 4 階中会議室 406 号(第 8 会場)
〒305-0032 茨城県つくば市竹園 1-10-1
主 催: 動物 MHC 研究会
共 催: 日本獣医学会微生物分科会

ヒトの組織適合性遺伝子複合体 (MHC) 領域は非常に多型性に富み、遺伝子密度も高く、疾患感受性遺伝子が集中的にマップされていることから、疾患の責任遺伝子の同定が進展している。また、ヒトでは、MHC・ペプチド相互作用の法則性が生化学的に解析され、自己免疫疾患におけるアロタイプ特異的な親和性を示すペプチドモチーフの同定などによる疾患発症機構の解明も進展している。

一方、家畜の MHC 領域は、MHC 遺伝子の他に、成長、泌乳量、繁殖性などの経済有用形質や乳房炎、牛白血病、マレック病などの抗病性に関与する遺伝子が多数マップされるという興味ある特徴を示すが、これらの形質や疾患の責任遺伝子の同定には至っていない他、疾患に関連した MHC・ペプチド相互作用の解析などもほとんど行われていない。最近、家畜のゲノム配列解読が進展し、経済形質や疾患の責任遺伝子を同定するためのゲノム配列情報が整いつつあり、動物種によっては、ヒトと同様のアプローチによる疾患責任遺伝子同定に向けた解析が開始されている。

本シンポジウムでは、愛玩動物および家畜の MHC における免疫応答性や疾患解析についての最新の情報を提供するとともに、ヒト MHC と疾患解析に関連した新戦略を紹介し、それらの情報を獣医学分野の疾病制御へと役立てるための方向性と臨床応用への展望を示したい。

9:00~10:20 座長 小野寺 節(東京大学), 中西 照幸(日本大学)

1. 動物 MHC 研究会からのお知らせ(理化学研究所 間 陽子)
2. ヒト MHC 拘束性癌抗原ペプチドを用いた癌免疫療法(熊本大学 西村 泰治)
3. ブタの MHC 及び免疫関連遺伝子の多型と肺炎等の日和見感染症との関連性の解析
(農業生物資源研究所 上西 博英・東海大学 安藤 麻子)

10:20~11:50 座長 小沼 操(北海道大学), 辻本 元(東京大学)

4. ニワトリ MHC とマレック病(東海大学 椎名 隆)
5. 白血病および乳房炎感受性とウシ MHC の遺伝的多様性(理化学研究所 間 陽子・竹嶋伸之輔)
6. 家猫 MHC 領域の SNP 及びマイクロサテライトタイピング——猫エイズ及び猫白血病ウイルスに対する感受性への応用—— (米国 国立癌研究所 柚木 直也)

(問い合わせ先: 理化学研究所 間 陽子 電話 048-462-4420, mail-address, aida@riken.jp)

● Original Article ●

Somatic mutations leading to incomplete extinction of HLA class I were associated with replication error phenotype-positive colorectal carcinoma

Tatsuhito Nouchi^{1,2)}, Michio Yasunami^{1,3)}, Ryuichi Mibu⁴⁾, Seigoh Yasunaga⁵⁾, Manatsu Itoh-Satoh¹⁾, Megumi Takahashi¹⁾, Shigefumi Tanaka²⁾, Hiroyuki Kuwano²⁾ and Akinori Kimura^{1,3)}

- 1) Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University
- 2) Department of General Surgical Science, Gunma University Graduate School of Medicine
- 3) Laboratory of Genome Diversity, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Biomedical Science
- 4) First Department of Surgery, Kyushu University Graduate School of Medicine
- 5) First Department of Medicine, Ooita Medical University

(Received for Publication: December 11, 2006)

Abstract: Hereditary non-polyposis colorectal carcinoma (HNPCC) is one of the prevalent inherited cancers in the general population. Underlying biological process impaired in HNPCC is DNA mismatch repair, which results in microsatellite instability and accumulation of frame-shift mutations within the tumor cells. Protein products of the mutant alleles are expected to be the altered self to the host immune system and become targets for the tumor-specific cytotoxicity. To explore the mechanism for HNPCC tumor cells to escape from the immune surveillance, we investigated the mutations in the beta 2 microglobulin (B2M) and HLA class I genes as well as the microsatellite instabilities in the colorectal cancers. It was found that either a frame-shift mutation of B2M gene or allele loss of HLA class I genes, which would lead to the extinction of HLA class I expression, were more prevalent in the HNPCC tumors than in the non-HNPCC tumors. Interestingly, none of the tumors exhibited complete loss of B2M or HLA class I genes. These observations strongly suggested that the extinction of HLA class I should be kept incomplete, because the complete loss might activate natural killer cells.

Key words: HLA class I, beta 2 microglobulin, colorectal cancer, HNPCC, immune surveillance

INTRODUCTION

Hereditary non-polyposis colorectal carcinoma (HNPCC) is one of inherited cancers in which a profound predisposition to carcinogenesis is transmitted as an autosomal dominant trait (1). HNPCC is clinically defined as a form of colorectal cancer with familial aggregation of at least three cases belonging to two or more successive generations, and about 5% of colorectal cancer are HNPCC (2). Cancer cells in patients with HNPCC usually exhibit a phenotype called as replication error (RER) that lead to the accumulation of multiple mutations in the tumor tissue (3, 4). It has been known that one of six human homologous loci for either *Escherichia coli* (mutHLS pathway) or *Saccharomyces cerevisiae* DNA excision repair genes is semi-inactivated in all body cells by a heterozygous germ-line mutation (5); mutations of any one of *MSH2* (HNPCC1, OMIM# 120453), *MLH1* (HNPCC2, OMIM# 609310), *PMS1* (HNPCC3, OMIM# 600258), *PMS2* (HNPCC4, OMIM# 600259), *MSH6* (HNPCC5, OMIM# 600678) and *MLH3* (HNPCC7, OMIM# 604395) can cause HNPCC, although the majority of HNPCC cases carried mutations in the former two loci (6).

Presence of more than one tumor foci is another characteristic of HNPCC, otherwise very rare in colorectal cancer except for the cases with familial adenomatous polyposis coli that is another inheritable susceptibility to the colorectal cancer. A gene for type II receptor of TGF beta, *TGFBR2*, is one of the most common targets for somatic mutations occurred during the tumorigenesis in the patients with RER-positive phenotype (7). It also is known that a germ line mutation in *TGFBR2* is a cause of non-typical RER-negative HNPCC (HNPCC6, OMIM# 190182). Hot spots of somatic mutation found in the RER-positive HNPCC tumors are mono-, di- and trinucleotide short tandem repeats (STRs). The RER phenotype has been evaluated with the observation of instability of STRs, also known as microsatellite instability (MSI), in humans as well as in yeasts (3).

There are several protocols for molecular diagnosis for the RER-positive HNPCC, in which a set of microsatellite loci are investigated to detect the MSI, and RER-positive phenotype is usually defined as that MSI was detected in more than one fourth (25%) of tested STR loci (8, 9).

As a result of mutation in the repetitive sequences, neoplastic cells are expected to possess frame-shift mutations in a number of loci, which, in turn, may cause inactivation of gene function and emerge non-natural polypeptides encoded by the out-of-frame nucleotide sequences. These non-natural polypeptides can be tumor antigens against which the host immune-surveillance system recognizes as the altered-self. Classical HLA class I molecules, HLA-A, B and C, which form heterodimers with beta 2 microglobulin (B2M), serve as presenting molecules of the altered-self peptides to CD8+ cytotoxic T lymphocytes (CTL) as an potent effector of the tumor immunity. Extinction of the classical HLA class I molecule from the cell surface, then, may be advantageous for tumor cells to escape from the surveillance of CTL. It also is well established that another host defense mechanism, natural killer (NK) cell system, can cope with missing-self neoplasm, for which HLA class I molecules may serve as makers of immunological self. Therefore, we hypothesized that the RER-positive tumor cells should manage balancing of these two host defense systems. In the present study, we examined colorectal cancer specimens for the somatic alterations in genes for HLA class I molecules and found that there was a striking difference in the manner of inactivation of these genes depending on the RER-positive or -negative phenotypes.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Seventy-six unrelated Japanese patients with non-polyposis colorectal cancer were enrolled in the present study. All the patients were received surgical resection at Kyushu University Hospital and the di-

agnosis of each tumor was confirmed by histopathology. Thirty-four of them (through H-01 to H-34; 45%) were either with positive family history in the first- or second-degree relatives and/or having multiple colorectal cancers (one patient carried triple tumors and three patients had double tumors), suggesting the presence of profound genetic predisposition to colorectal cancer including HNPCC. The other forty-two (S-01 to S-42; 55%) were sporadic cases with the solitary tumor. After acquiring written informed consent, tumor tissues were surgically obtained. The neoplastic tissue and adjacent normal mucosa were separated, frozen in liquid nitrogen, and stored at -20°C until preparation of genomic DNA. Experimental protocols were approved by Ethics Reviewing Committee of Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University and Institutional Review Board of Kyushu University Hospital.

DNA preparation and analysis

Frozen tissue samples were minced by Polytron homogenizer in tissue lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 75 mM NaCl, 20 mM EDTA \cdot Na₂). Immediately after homogenization, proteinase K (Merck) and SDS were added at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1%, respectively, and incubated at 55°C for 4 hours. After at least three times of extraction with neutralized phenol and chloroform, DNA was salted-out by adding 0.6 volume of isopropanol. Cotton wool-like DNA precipitate was washed twice in 70% ethanol and re-dissolved in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA \cdot Na₂ at 50–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. DNA regions of interest were amplified by polymerase chain reaction (PCR) in a 30 μl reaction with appropriate primer pairs. Nucleotide sequences of the primers are available upon request. For the detection of mutation, single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was employed. In brief, 3 μl of PCR product was denatured in 50% formamide at 95°C for 5 minutes prior to 8% polyacrylamide-0.8 \times TBE (1 \times TBE: 44.5 mM Tris-borate, 1 mM EDTA \cdot Na₂ pH 8.8) either with or with-

out 10% glycerol. DNA fragments in the gel were visualized by using silver staining kit (Daiichi Chemical). The samples demonstrating aberrant mobility were subjected to direct sequencing using PCR product as a template. Sequencing was performed on both strands using the Big Dye Terminator Cycle sequencing kit and the ABIPRISM 310 capillary sequencer.

Determination of RER phenotype

Polymorphic microsatellite loci were used to study the RER phenotype. Paired tumor and normal DNA samples were genotyped by PCR at 32 microsatellite loci as described previously (10). MSI was detected in tumor DNA where repair error had taken place, and when MSI was found at more than 25% of examined loci, the sample was considered to be RER-positive.

HLA DNA typing

Genotyping of *HLA-A* and *-B* loci was performed to investigate the allele loss in tumor as compared with corresponding normal tissue. Reference strand-mediated conformation analysis (RSCA) was the method of choice (11). Paired samples were analyzed in parallel with *HLA-A* or *HLA-B* RSCA kit (Pel-Freeze Clinical Systems) optimized for ALFexpress system (Amersham Pharmacia Biotech). Allele assignments were made by ALFwin Software (Amersham Pharmacia Biotech) determining migration values of heteroduplexes formed using the kit reagents and amplified sample DNA.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by Fisher's exact test. When p value was less than 0.05, the association was considered statistically significant. The strength of association was evaluated by odds ratio (OR) calculated with Woolf's formula and Haldane's modification when suitable (12).

RESULTS

RER phenotyping of colorectal cancer

We examined 81 tumor samples from 76 cases, including three double and one triple cancer cases, of colorectal cancer patients for RER phenotype by detecting MSI at 32 polymorphic STR loci. A part of these patients were enrolled in our previous study concerning to mutations in *E2F4* target in the RER-positive tumors (10). Nine tumors from eight patients

(H-01, H-04, H-05, H-17, H-21, H-26, H-34, and S-11) were positive for RER phenotype, if the RER phenotype was defined as the cases with MSI detected at more than 25% of the examined STR loci (Table 1). Seven out of the eight patients were either with apparent family history of colorectal cancer or carrying multiple colorectal cancers, suggesting the presence of genetic predisposing factor. The frequency of RER phenotype was more prevalent in the patients

Table 1. Mutations in genes encoding HLA class I in colorectal cancer

Patient	Tumor-ID	%MSI	RER#1	FH#2	MC#3	Mutation
(beta 2 microglobulin mutants)						
H-04	G022T	81	yes	yes	yes	93ins1
H-34	K23C	76	yes	no	yes	68del1
H-26	G106T	74	yes	yes	no	13del2
H-01	G001T	57	yes	yes	no	13del2 and Met1 Val#4
H-21	G092T	57	yes	no	yes	13del2
(HLA class I LOH mutants)						
H-05	G025T1	62	yes	yes	yes	HLA-A, -B, -C LOH
H-05	G025T2	62	yes	yes	yes	HLA-B LOH
H-17	G070T	56	yes	yes	no	HLA-B LOH
S-11	G085T	52	yes	no	no	HLA-A, -B, -C LOH
S-09	G066T	13	no	no	no	HLA-A, -C LOH
H-09	G032T	0	no	no	yes	HLA-B, -C LOH
H-24	G101T	0	no	no	yes	HLA-B LOH
S-10	G068T	0	no	no	no	HLA-B LOH
S-15	G090T	0	no	no	no	HLA-A, -B, -C LOH
S-16	G093T	0	no	no	no	HLA-B, -C LOH
S-30	K01C	0	no	no	no	HLA-A, -C LOH
S-37	K14C	0	no	no	no	HLA-A, -B, -C LOH
S-38	K15C	0	no	no	no	HLA-A, -B, -C LOH

#1; replication-error phenotype, #2; family history of colon cancer, #3; multiple cancers, #4; Met (ATG) to Val (GTG) mutation

with the genetic predisposition (7 out of 34 cases; 20.6%) than in patients with non-familial solitary tumor (1 out of 42; 2.4%).

Diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) by mutation analysis

All 81 tumor DNA and 76 normal tissue DNA samples were subjected to a search for both somatic and germ line mutations in two of the replication error repair genes, *MSH2* and *MLH1*, in order to establish the diagnosis of HNPCC. Three patients (H-04, H-05 and H-17) carried mutations in *MSH2* and other three (H-01, H-26 and S-11) had heterozygous mutations in *MLH1*. Tumors from these 6 patients (9 specimens) consistently exhibited the RER phenotype.

Mutation patterns of oncogenes in RER-positive and -negative tumors

It is well-established that the cancerous tissues accumulate somatic mutations in oncogenes and tumor-preventing genes, which both regulate intracellular signaling to promote cell growth, cell-cycle progression, inhibition of apoptotic response in over-stimulated cells or other mechanisms. Both gain-of-function and loss-of-function may take place depending on the function of the genes during the tumor progression. Loss-of-function mutation can in part be detected as a loss of heterozygosity (LOH), which is one of the common mechanisms to get the loss of normal gene function for preventing tumorigenesis. Therefore we sought the mutations in the oncogenes as well as the LOH type mutations in both RER-positive and -negative tumors. The frequencies of *Ki-ras* mutations between the RER-positive and -negative tumors were not significantly different (36.4% vs. 35.2%), suggesting that the gain-of-function type *Ki-ras* mutation was essentially indifferent of the RER phenotype. However, frame-shift mutation due to the insertion or deletion of a single nucleotide or more, another type of gene-inactivation mutation, was almost exclusively found in the RER-positive tumors.

For example, mutations in the type II TGF beta receptor gene (*TGFBR2*) at a hotspot of (A)₁₀ corresponding to codons 125–128 (7) were found in 10 of 11 RER-positive tumors (90.9%), while only 2 of 71 RER-negative tumors (2.8%) carried the *TGFBR2* mutations. This observation was in good accordance with the result of the previous study (7).

Inactivation of beta 2 microglobulin (B2M) gene

Next we searched for somatic gene alterations which would result in the attenuation of antigen presentation to CTL. As showed in Figure 1, PCR-SSCP analysis demonstrated abnormal band patterns in the single-stranded DNA or double-stranded DNA. Since most of the abnormal band patterns were found in the double-stranded DNA, it was suggested that most of the B2M mutations were insertion or deletion mutations forming heteroduplex which can be easily detected in the analysis. Subsequent sequencing analysis revealed that five tumors indeed carried heterozygous frame-shift mutations due to either insertion or deletion of nucleotide(s) at the repetitive sequences in the protein coding region. Three carried 13del2 (the deletion of one unit of dinucleotide repeat (CT)₄), one had 68del1 (one nucleotide deletion at homopolymeric sequence of (A)₅), and one showed 93ins1 (one nucleotide insertion at homopolymeric sequence of (A)₅) (Table 1). Interestingly, the frame-shift mutations in B2M gene were found exclusively in the RER-positive tumors; 5 of 11 RER-positive tumors (45.5%) carried the B2M mutations, while no mutation was observed in 70 RER-negative tumors (OR = 121.0, $P = 1.8 \times 10^{-5}$; Table 2). Another interesting finding was that there was no case which carried B2M frame-shift mutations on both chromosomes, although one tumor (G001T) had another mutation (Met1Val, missense mutation) on the same chromosome (Table 1).

LOH of HLA class I heavy chain loci

We next examined *HLA-A*, *-B* and *-C* loci for LOH in the tumor samples by using SSCP analysis (Figure

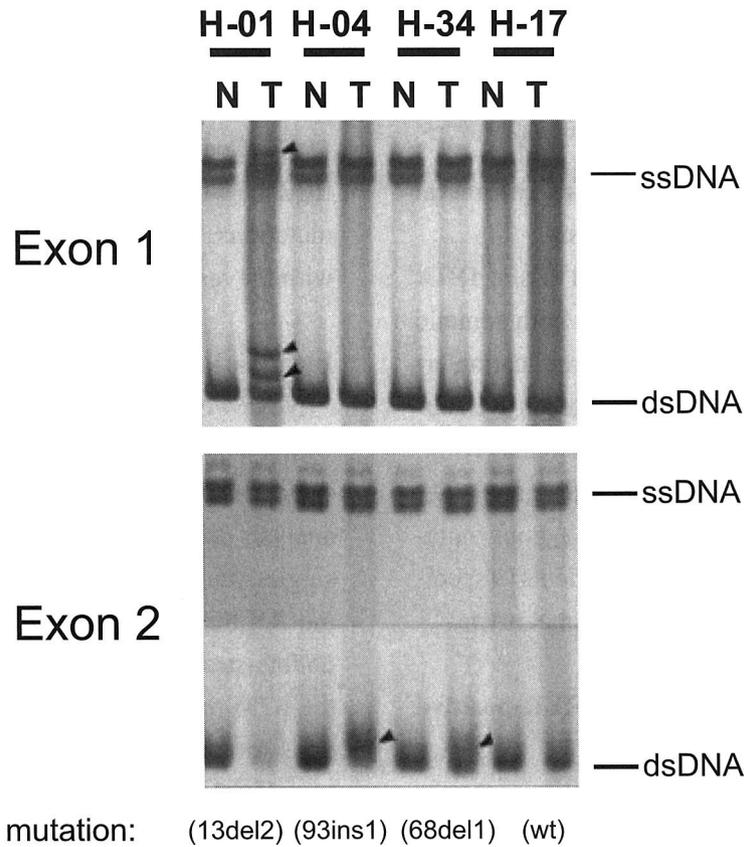


Figure 1. SSCP analysis of B2M gene.

Pairs of DNA samples derived from tumor (T) and corresponding normal mucosa (N) were analyzed for polymorphisms in exons side by side. Upper and lower panels showed representative results for the analysis of exon 1 and exon 2, respectively. Both single-stranded DNA (ssDNA) and double-strand DNA (dsDNA) bands were visualized by silver staining. Bands of aberrant mobility due to either SSCP or heteroduplex between mismatched pairing were indicated by arrowheads. Mutations were found in exon 1 in tumor from H-01 and in exon 2 of tumors from H-04 and H-34, and these were confirmed by nucleotide sequencing as noted below the figures.

Table 2. Beta2 microglobulin mutants were found in RER-POSITIVE tumors (N = 81)

Phenotype	heterozygous B2M mutants	wild type	OR*	P
RER-positive	5	6	121.0	1.8x10 ⁻⁵
RER-negative	0	70		

*OR: odds ratio, calculated with Haldane's modification of Woolf's formula

Table 3. Mutations which result in HLA class I extinction in RER-POSITIVE tumors (N = 9)

HLA LOH	heterozygous B2M mutants	wild type	OR*	P
Absent (wild type)	5	0	3.87	0.0079
Present	0	4		

*See footnote of Table 2

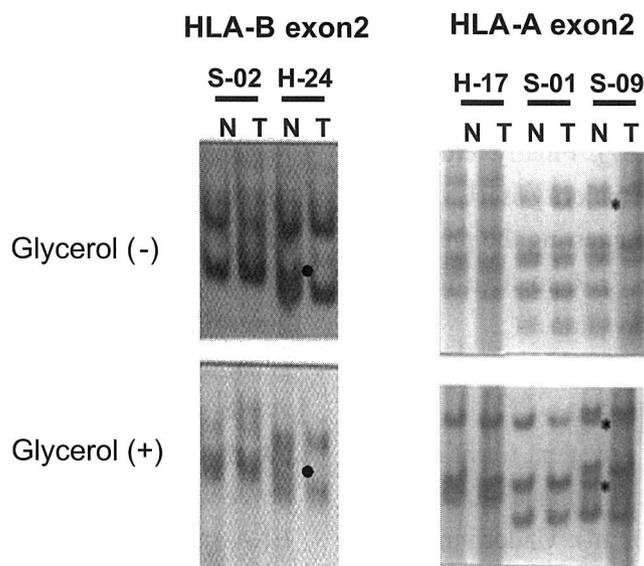


Figure 2. SSCP analysis of HLA class I genes

Paired samples (T; tumor and N; normal mucosa) were analyzed for polymorphism in exons of HLA class I genes. Representative results are shown for exon 2 of HLA-B (left panels) and exon 2 of HLA-A (right panels) in polyacrylamide gels without (upper panels) and with (lower panels) 10% glycerol. LOH of HLA-B was found in the tumor from H-24 and LOH of HLA-A was observed in the tumor from S-09 as indicated by dots.

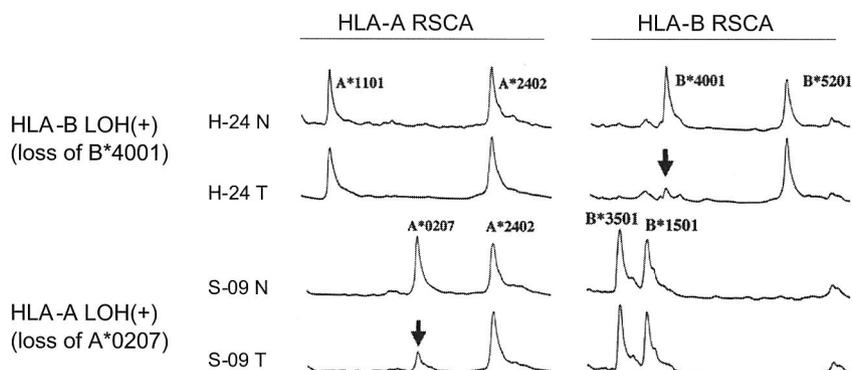


Figure 3. Allele loss detected by RSCA of HLA class I loci.

Paired samples were analyzed by using RSCA typing method according to the kit procedures. A part of heteroduplex mobility data used for typing was shown. Allele loss was detected by diminished intensity of signal indicated by arrows. B*4001 was the allele lost in the tumor from H-24, while A*0207 was lost in the tumor from S-09.

2). LOH in at least one of three MHC class I loci was found in 4 out of 11 (36.4%) RER-positive tumors and in 9 out of 70 (12.9%) RER-negative tumors (Table 1). Though the frequency of LOH in MHC loci was increased in the RER-positives, it was not statistically significant (OR = 3.87, P = 0.070). In addition, we determined the type of HLA class I allele that was lost during the tumor progression by using RSCA

method as shown in Figure 3, but we found no preference of HLA allele to be lost or retained in the colorectal cancers. The most striking finding was that LOH of HLA class I loci was never coincident with the B2M mutations in the RER-positive tumors (Table 3). A statistical test rejected a null hypothesis that the LOH mutation in the HLA loci and the frame-shift mutations in the B2M gene took place independently

($P = 0.0079$). Consequently, the alternative hypothesis that the occurrence of HLA class I gene mutations and B2M gene mutations was correlated to each other was accepted ($OR = 3.87$). Finally, either of these mutations account for the majority of RER-positive tumors ($9/11 = 81.8\%$), suggesting the presence of negative selection for the RER-positive tumors against intact HLA class I expression.

DISCUSSION

HNPCC is one of the most prevalent forms of hereditary cancer syndrome, occupying about 5% of primary colorectal cancer (13, 14). Underlying impaired biological process in the patients with HNPCC is in the DNA repair system, known as mismatch repair of replication errors (5, 6). It remains unknown why colon epithelium and endometrium, which is another tissue with prevalent cancers found in the HNPCC pedigrees, are vulnerable to the genetic lesion involving this fundamental cellular activity (15). However, genomic instability at STR is a common phenomenon found in the tumors occurred in HNPCC (6), and the insufficiency of *TGFBR2*, a putative determinant of malignant transformation (7), is a target of RER in HNPCC, i.e., consecutive (A)¹⁰ within the protein coding sequence.

Similarly to *TGFBR2*, tumors in HNPCC are expected to possess a number of mutations in STR sequences all along the genome, which can be accumulated during tumor cell growth due to the defect in mismatch repair. Mutations at STR sequences within the protein coding sequences can result in the impairment of normal gene function and the out-of-frame mutations lead to production of non-natural (altered-self) polypeptides in the cancer cells. Therefore, the tumor cells in HNPCC should be more prone to be recognized as the altered-self by the host surveillance system. Indeed, the correlation between MSI and extent of immune cell infiltration in tumor tissues was reported (16).

HLA-A, *-B* and *-C* loci encode for classical human

major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chains that non-covalently form heterodimers with B2M. Since MHC class I serve as an antigen presenting molecule to antigen-specific CTL, extinction of MHC class I may be a strategy of tumors to escape from antigen-specific CTL (17). In order to down-regulate MHC class I expression, tumors may prone LOH of MHC genes and mutations in B2M gene, as demonstrated in the present study. These events should be rare even in the unstable genomic integrity within the neoplastic cells, because we have never observed any coincidence of LOH mutations in HLA and RER-related B2M mutations. We have not investigated the expression of HLA molecules at the mRNA or protein levels. However, previous reports demonstrated that heterozygous frame-shift mutations of the B2M gene caused lower expression of HLA molecules in colon cancer cell lines as well as in primary colon cancers (18, 19), suggesting that B2M mutations found in this study also lead to decreased HLA expression. Contribution of the possible attenuation in tumor-specific antigen presentation during tumor progression might be underestimated in the present study, because it was reported that several other components involved in antigen presentation such as TAP genes were also impaired during the cancer development (20, 21).

NK cell is another subset of lymphoid cells, which exhibit cytotoxicity against the neoplastic cells. In addition, NK cells possess immune regulatory activities such as gamma-interferon production. So the infiltration of NK cells in the tumor may be a sign of good prognosis (22). MHC class I molecules also serve as ligands for NK cell receptors. Presence of the MHC class I molecules on the target cells suppresses the killing activity of NK cell via killer immunoglobulin receptors, and NK cells are activated upon the lost of MHC class I from the cell surface. Therefore, loss of MHC class I expression which provides tumor cells with a benefit to escape from tumor-specific CTL may be harmful for them to be

come a target for another host surveillance system enrolling NK cells (23, 24). The incomplete extinction of HLA class I expression found in the present study may be preferable for tumor cells to survive against immune surveillance system *in vivo*.

In conclusion, neoplastic cells in the colorectal cancer with RER-positive phenotype were shown to possess different subset of gene mutations from those with RER-negative phenotype. The RER-positive tumors were more prone to be recognized as altered-self than the RER-negative tumors, therefore, gained genetic alteration(s) leading to incomplete inactivation of HLA class I expression.

REFERENCES

1. Lynch H. T., Lynch P.: The cancer-family syndrome: a pragmatic basis for syndrome identification. *Dis. Colon Rectum* **22**: 106–110, 1979.
2. Lynch H. T.: Frequency of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndromes I and II). *Gastroenterology* **90**: 486–492, 1986.
3. Parsons R., Li G.-M., Longley M. J., *et al.*: Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER(+) tumor cells. *Cell* **75**: 1227–1236, 1993.
4. Lynch H. T., Lynch P. M.: Molecular screening for the Lynch syndrome — better than family history? *New Eng. J. Med.* **352**: 1920–1922, 2005.
5. Fishel R., Lescoe M. K., Rao M. R. S. *et al.*: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **75**: 1027–1038, 1993.
6. Liu B., Parsons R., Papadopoulos N, *et al.*: Analysis of mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Nature Med.* **2**: 169–174, 1996.
7. Markowitz S., Wang J., Myeroff L., *et al.*: Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* **268**: 1336–1338, 1995.
8. Umar A., Risinger J. I., Hawk E. T., *et al.*: Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **4**: 153–158, 2004.
9. Lipton L. R., Johnson V., Cummings C., *et al.*: Refining the Amsterdam Criteria and Bethesda Guidelines: Testing algorithms for the prediction of mismatch repair mutation status in the familial cancer clinic. *J. Clin. Oncol.* **22**: 4934–4943, 2004.
10. Ikeda M., Orimo H., Moriyama. H, *et al.*: Close correlation between mutations of E2F4 and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* **58**: 594–598, 1998.
11. Arguello J. R., Little A. M., Pay A. L., *et al.*: Mutation detection and typing of polymorphic loci through double strand conformation analysis. *Nat. Genet.* **18**: 192–194, 1998.
12. Haldane J. B. S.: The estimation and significance of the logarithm of a ratio frequencies. *Ann. Hum. Genet.* **20**: 309–311, 1956.
13. Ponz de Leon M., Sassatelli R., Benatti P., *et al.*: Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. The 6-year experience of a population-based registry. *Cancer* **71**: 3493–3501, 1993.
14. Riegler G., Savastano A., Selvaggi F., *et al.*: Prevalence of HNPCC in a series of consecutive patients on the first endoscopic diagnosis of colorectal cancer: a multicenter study. The Italian Collaborative Group. *Endoscopy* **31**: 337–341, 1999.
15. Millar A. L., Pal T., Madlensky L., *et al.*: Mismatch repair gene defects contribute to the genetic basis of double primary cancers of the colorectum and endometrium. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 823–829, 1999.
16. Takemoto N., Konishi F., Yamashita K., *et al.*: The correlation of microsatellite instability and tumor-infiltrating lymphocytes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and sporadic colorectal cancers: the significance of dif-

- ferent types of lymphocyte infiltration. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **34**: 90–98, 2004.
17. Liu K., Caldwell S. A., Greenelch K. M., *et al.*: CTL adoptive immunotherapy concurrently mediates tumor regression and tumor escape. *J. Immunol.* **176**: 3374–3382, 2006.
18. Bicknell D. C., Rowan A., Bodmer W. F.: β 2-microglobulin gene mutations: A study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4751–4755, 1994.
19. Bicknell D. C., Kaklamanis L., Hampson R., *et al.*: Selection for β 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinoma. *Curr. Biol.* **6**: 1695–1697, 1996.
20. Nie Y., Yang G.-Y., Song Y., *et al.*: DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* **22**: 1615–1623, 2001.
21. Yang T., Lapinski P. E., Zhao H., *et al.*: A rare transporter associated with antigen processing polymorphism overrepresented in HLA low colon cancer reveals the functional significance of the signature domain in antigen processing. *Clin. Cancer Res.* **11**: 3614–3623, 2005.
22. Coca S., Perez-Piqueras J., Martinez D., *et al.*: The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* **79**: 2320–2328, 1997.
23. Menon A. G., Morreau H., Tollenaar R. A., *et al.*: Down-regulation of HLA-A expression correlates with a better prognosis in colorectal cancer patients. *Lab. Invest.* **82**: 1725–1733, 2002.
24. Sandel M. H., Speetjens F. M., Menon A. G., *et al.*: Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol. Immunol.* **42**: 541–546, 2005.

DNA 複製エラーを呈する大腸がんには HLA クラス I 分子の発現異常をもたらす体細胞変異が集積する

野内達人^{1,2)}, 安波道郎^{1,3)}, 壬生隆一⁴⁾, 安永正剛⁵⁾, 伊藤・佐藤真夏¹⁾,
高橋めぐみ¹⁾, 田中司玄文²⁾, 桑野博行²⁾, 木村彰方^{1,3)}

- 1) 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子病態
- 2) 群馬大学・大学院医学系研究科・病態総合外科学
- 3) 東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学部・ゲノム多様性
- 4) 九州大学・医学部・第一外科
- 5) 大分医科大学・第一内科

要約: 遺伝性非ポリポーシス大腸がん (HNPCC) は頻度の高い遺伝性高発がん疾患である。HNPCC の原因は DNA ミスマッチ修復酵素の欠損であり、がん細胞においてはマイクロサテライト不安定性とフレームシフト変異が集積することが知られている。このような体細胞変異はがん特異的細胞障害 T 細胞によって非自己として認識されるタンパク産物を生じると考えられる。そこで本研究では、そのような体細胞変異を集積した非自己であるがん細胞が免疫監視機構から逸脱する分子機構を解明するために、大腸がんを対象としてマイクロサテライト不安定性ならびに HLA クラス I 遺伝子と β 2 ミクログロブリン遺伝子 (B2M) 変異の有無を検討した。その結果、マイクロサテライト不安定性を示す HNPCC 大腸がんにおいては、HLA クラス I 分子の発現低下をもたらすと考えられる B2M のフレームシフト変異または

HLA クラス I 遺伝子の LOH 型変異が非 HNPCC 大腸がんと比較して有意に多いことが判明した。興味深いことに、B2M 変異と HLA クラス I 遺伝子変異の両者を同時に有する大腸がんは認められなかった。これらのことから、DNA 複製エラーを伴う大腸がんは、HLA クラス I 分子の発現欠損を不完全とすることで細胞障害性 T 細胞と NK 細胞のいずれによる認識からも逸脱することが示唆された。

キーワード： HLA クラス I, β 2 ミクログロブリン, 大腸がん, HNPCC, 免疫監視機構

第10回 HLA-QC ワークショップレポート

第10回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過—

木村彰方, および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

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. ワークショップ集会までの経過

今回で通産 10 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 17 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。昨年度から, DNA タイピング QC (DNA-QC) と抗体を用いた QC (抗体 QC) を実施している。平成 17 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 18 年 3 月の締め切りまでに 194 名 (78 施設) から参加申し込みがあった。参加申し込み, 参加者との連絡のいずれについても原則としてインターネットを利用 (HP からの申し込み, 電子メール連絡) することとして運営した。参加者数が確定した 4 月に, QCWS 部会において, 具体的なサンプルの選定, QCWS のテーマ (後述) の決定と電子媒体を用いたデータ収集の方法を決定した。ついで, 5 月に施設単位としてサンプルを送付した。平成 18 年 6 月末のデータ送付締め切りまでに, 75 施設から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取りまとめ, 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) 日常的に遭遇しない珍しいタイプ, (2) ろ紙サンプル, (3) 全ゲノム増幅 (WGA) サンプル, (4) タイピング精度 (再現性) の検討をテーマとし, 抗体 QC 部門は, (1) 抗体特異性, (2) 似通った抗原エピトープの認識, (3) 方法論による特異性, 精度に関する比較, (4) B 座の鋭敏な抗体特異性の検討をテーマとした。医療業務 (臨床検査など) 以外で行われるヒト試料の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審査委員会を設置し, 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。今回の QCWS 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

表1 第8回 QCWS の実施経過

平成17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) ろ紙サンプル、3) 全ゲノム増幅サンプル、4) タイピング精度 (再現性) 抗体 QC 部門; 1) 抗体特異性、2) 似通った抗原エピトープの認識、3) 方法論による特異性、精度に関する比較、4) B 座の鋭敏な抗体特異性
平成17年11月	第10回 QCWS 案内の作成、 「MHC」およびHP への掲載
平成18年3月	参加申し込み; 78施設 (194名) DNA-QC 参加: 72施設、抗体 QC 参加: 43施設
平成18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 部会にて解析担当者の決定、QCWS 集会の方針決定
平成18年4月下旬-5月中旬	QCWS サンプルの配布、 倫理審査委員会での審議に基づき、同意誓約書を取得
平成18年7月上旬	データ回収締め切り
平成18年7月-8月	QCWS データ解析
平成18年9月上旬	QCWS 集会用資料配布

表2 QCWS サンプル (DNA 部門) の形態と容量

サンプルID	形態	容量
H1801	ゲノム DNA 溶液	4 μ g
H1802	ゲノム DNA 溶液	4 μ g
H1803	ゲノム DNA 溶液	4 μ g
H1804	WGA-DNA 溶液	1 μ g
H1805	ろ紙付着細胞	3 \times 10 ⁵ 細胞
H1806	ろ紙付着細胞	3 \times 10 ⁵ 細胞

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 力価	備考
SH1801	抗血清	A26	x1	x2 \rightarrow A26(negative A*2603)
SH1802	抗血清	A25 A26 A66	x1-2	
SH1803	抗血清	(-)	x1	FlowPRA Scr. class I (+)class II (+)
SH1804	抗血清	B35 B53	x1-4	

入れられるもの)を用いることとしたが、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。さ

らに研究試料の目的外使用の禁止、各施設から寄せられたデータを解析することの承諾を含めて、参加者から同意誓約書の提出を受けた上で試料を配布した。なお、同意誓約書の提出がなかった施設が1施

設あったが、上述の理由から当該施設には試料を配布しなかった。

3. 参加者・参加施設

参加者は総数 194 名であり、以下の 78 施設に所属していた。参加者数、参加施設数とも昨年より微増であった。なお、QCWS 集会のみへの当日参加は 34 名であった。

参加施設名

札幌北楡病院・臨床検査科、岩手医科大学附属病院中央臨床検査部、鷹揚郷腎研究所弘前病院 HLA 検査室、北海道大学病院 検査部、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・技術営業部、東京大学医学系研究科人類遺伝学分野、東邦大学医療センター大森病院輸血部、中央血液研究所研究開発部研究二課、東京都赤十字血液センター・検査三課、NPO 法人腎泌尿器疾患研究所、東京女子医大 腎センター移植免疫研究室、遺伝子検査部 遺伝子検査 G (三菱ビーシーエル)、(株)エスアールエル 遺伝子・染色体解析センター 遺伝子検査課、北里大学病院 臨床検査部、横浜市立大学附属病院・輸血部、神奈川県赤十字血液センター 検査部検査一課、東海大学医学部 教育研究支援センター、東海大学医学部基礎医学系分子生命科学、東海大学医学部附属病院・細胞移植再生医療科、千葉東病院研究検査科、千葉県赤十字血液センター検査二課、茨城県赤十字血液センター検査課、自治医科大学附属病院 輸血細胞移植部、埼玉医科大学病院 臓器移植センター、株式会社ピー・エム・エル 特殊分析部、防衛医科大学校病院・検査部研究室、長野赤十字病院 中央検査部、信州大学医学部 法医学、医学生物学研究所 応用技術部、静岡県立総合病院 検査部、名古屋第二赤十字病院 HLA 検査室、愛知県赤十字血液センター検査二課、岐阜大学病院 検査部、岐阜赤十字病院 検査部、三重県赤十字血液センター・技術課、三重大学医学部附属病院輸血部、大阪府赤十字血液センター技術部、大阪府赤十字血液センター検査二課、大阪市立大学医学部附属病院輸血部、国立循環器病センター輸血管理室、関西医科大学附属枚方病院輸血部、大

阪府立急性期総合医療センター・組織適合検査室、NPO HLA 研究所、京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部、兵庫県赤十字血液センター・検査 1 課、松江赤十字病院 検査部輸血管理室、岡山県赤十字血液センター検査課、広島県赤十字血液センター検査課、県立広島病院 輸血部、湧永製薬(株)バイオ事業開発部、山口県赤十字血液センター、香川県立中央病院中央検査部、徳島大学病院・輸血部、高知医療センター・三菱 BCL ラボ、愛媛県立衛生環境研究所 疫学情報科、九州大学病院臨床腫瘍外科、福岡大学内科学第 4、福岡赤十字病院 検査部 HLA 検査室、福岡県赤十字血液センター検査 2 課、佐賀県立病院好生館 検査科、長崎大学・熱帯医学研究所・疾病生態、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・検査課、大分県立病院中央検査部、沖縄県立中部病院 検査科、金沢医科大学病院・中央臨床検査部(北陸腎移植 HLA 検査センター)、石川県赤十字血液センター検査課、富山大学附属病院、立川メディカルセンター、立川総合病院 血清検査、新潟市民病院 臨床検査科、新潟県赤十字血液センター検査課、G&G サイエンス株式会社 研究開発グループ、福島県立医科大学医学部附属病院 輸血・移植免疫部、宮城県赤十字血液センター、仙台社会保険病院 研究部、山形県立中央病院 輸血部(以上のべ 78 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ったため、昨年度に引き続き、認定制度の主旨にそった試料の構成や選択を行い、QCWS 集会の前に試料の構成を公表し、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10回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —クラス I およびクラス II 総合判定データ解析—

柏瀬貢一, 峯元睦子⁴⁾, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. はじめに

昨年同様, 今年度も総合判定データ解析をクラス I とクラス II を一つにまとめて行い検査報告数の多かった 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. ローカス別の正解率

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 66 施設の内, 50 の施設が SSO 法を使用していた。SSP 法は 26 施設, SBT は 10 施設, RFLP が 3 施設と昨年と同様な傾向であった。また, 昨年 2 施設で使用されていた SSCP 法による報告が今年 は 1 施設であった。

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。今回は, データを提出した 66 施設のうち, DRB1 が 65 施設, B ローカスが 64 施設, A ローカスが 63 施設の報告があった。

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 66 施設の内, 14 施設が SSO

表 1 検査方法別

検査方法	報告数
SSO	50
SSP	26
SBT	10
RFLP	3
SSCP	1

表 2 ローカス別

ローカス	報告数
A	63
B	64
C	37
DRB1	65
DRB3/4/5	34
DQA1	3
DQB1	28
DPB1	2

表3 検査方法およびローカス別

検査方法	ローカス														合計
	ABC DRB1 DRB3/4/5 DQB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1	ABC DRB1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQB1	ABC DRB1 DRB3/4/5	ABC DRB1	AB DRB1 DRB3/4/5 DQB1	AB DRB1 DRB3/4/5	AB DRB1	B	DRB1 DQB1	DRB1		
SSO	1				1	2(1)		4	1	14	6	1		1	31
SSP	5					3				4			1		13
SSP+SSO	4			1		2		2							9
SSO+SBT						1		2			1				4
SBT								2(1)							2
SSO+RFLP	1						1								2
SSP+SSO+SBT	(1)		1												2
SSP+SBT	(1)														1
SSP+SSO+SSCP	1														1
SSO+SBT+RFLP						1									1
合計	14	1	1	1	1	9	1	10	1	18	7	1	1	1	66

WGA (whole genome amplification) を使用した数値を () にて示した。

表4 使用検査方法数別

検査方法数	報告数
1法	46
2法	16
3法	4

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	
A	H1801	A2	*0201 (*02)	62	62	100.0%	56	56	100.0%
		-	-						
	H1802	A210(A2)	*0210 (*02)	62	62	100.0%	56	56	100.0%
		A30	*3001 (*30)						
	H1803	A203(A2)	*0203 (*02)	62	60	96.8%	56	52	92.9%
		A29	*2901 (*29)						
	H1804	A210(A2)	*0210 (*02)	57	57	100.0%	54	54	100.0%
		A30	*3001 (*30)						
H1805	A2	*0201 (*02)	50	50	100.0%	47	47	100.0%	
	-	-							
H1806	A210(A2)	*0210 (*02)	48	48	100.0%	46	45	97.8%	
	A30	*3001 (*30)							
合計および平均			341	339	99.4%	315	310	98.4%	

だけを用いて A, B, DRB1, DRB3/4/5 の検査を行っていた。さらに、ローカスの組み合わせでは、A, B, DRB1, DRB3/4/5 が 18 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46と最も多かった。昨年は4法以上を用いて検査を行った施設が3施設あったが、今年はゼロであった。

3.5. ローカス別正解率

表5から表8にそれぞれのローカスの正解率を示した。すべてのローカスについて、高い正解率が得られた。しかしながら、H1803はSSP(JPN)法において、A*2901が検出されないため、他のサンプルに比べ低い正解率であった。なお、H1803は昨年の本ワークショップにおいてH1702として使用されたサンプルで、昨年も同様にA*2901がSSP(JPN)法により検出されないことが指摘されていた。

また、H1803のCローカスについてもSSP(JPN)

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	
B	H1801	B45(B12) -	*4501 (*45) -	63	63	100.0%	56	55	98.2%
	H1802	B13	*1302 (*13)	63	63	100.0%	56	54	96.4%
		B61(B40)	*4006 (*40)						
	H1803	B7	*0705 (*07)	63	62	98.4%	56	54	96.4%
		B76(B15)	*1519 (*15)						
	H1804	B13	*1302 (*13)	59	59	100.0%	55	52	94.5%
		B61(B40)	*4006 (*40)						
H1805	B45(B12) -	*4501 (*45) -	51	51	100.0%	48	48	100.0%	
H1806	B13	*1302 (*13)	48	48	100.0%	46	44	95.7%	
	B61(B40)	*4006 (*40)							
合計および平均			347	346	99.7%	317	307	97.8%	

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	
C	H1801	(Cw16) -	*1601 (*16) -	31	31	100.0%	30	29	96.7%
	H1802	Cw6	*0602 (*06)	37	37	100.0%	31	31	100.0%
		Cw8	*0801 (*08)						
	H1803	(Cw4)	*0403 (*04)	36	35	97.2%	33	31	93.9%
		(Cw15)	*1505 (*15)						
	H1804	Cw6	*0602 (*06)	30	30	100.0%	27	26	96.3%
		Cw8	*0801 (*08)						
H1805	(Cw16) -	*1601 (*16) -	25	25	100.0%	25	25	100.0%	
H1806	Cw6	*0602 (*06)	26	26	100.0%	24	24	100.0%	
	Cw8	*0801 (*08)							
合計および平均			185	184	99.5%	170	166	97.6%	

CローカスはDNA型を記載することになっているがHLA型で記載してきた施設もLowの集計対象とした

表8 DR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	
DR	H1801	DR13(DR6) -	*1301 (*13or*06) -	62	62	100.0%	56	55	98.2%
	H1802	DR7	*0701 (*07)	64	64	100.0%	59	59	100.0%
		DR9	*0901 (*09)						
	H1803	DR10	*1001 (*10)	63	62	98.4%	59	59	100.0%
		DR15(DR2)	*1502 (*15or*02)						
	H1804	DR7	*0701 (*07)	55	55	100.0%	50	50	100.0%
		DR9	*0901 (*09)						
H1805	DR13(DR6) -	*1301 (*13or*06) -	51	51	100.0%	47	46	97.9%	
H1806	DR7	*0701 (*07)	54	54	100.0%	51	51	100.0%	
	DR9	*0901 (*09)							
合計および平均			349	348	99.7%	322	320	99.4%	

法によるミスアサインにより他のサンプルに比べ低い正解率であった。

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。さらに、昨年指

摘された SSP (JPN) 法によるミスアサインについても改善されていないなど問題点が見られた。今後

も継続的にワークショップを行い、HLA タイピングの技術向上に役立てることが重要である。

第 10 回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —方法論別データ検討 (PCR-SSO)—

酒巻建夫, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. 参加施設

SSO 法を使用した施設は 49 施設あり解答を寄せた 66 施設の 74% 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参加施設が減っているため、他の方法と比較すると相対的には増加していた。

2. SSO キットの使用状況

個々の 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 23 施設で 49%, 湧永 MPH が 5 施設で 10%, ルミネックススビーズ法が 21 施設で 43%, 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スビーズ法の使用が増加していた(表 1)。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 17 施設 17/23 (74%), 全 66 施設中では 26%, MPH 単独使用が 3 施設で 3/5 (60%), 全体のなかで 4.5%, ルミネックス法が 11 施設で 11/21 (52%), 全体のなかでは 17% 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 17%, SBT 法は 3 施設で 3/8 (37.5%), 全施設中で 4.5% 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していることを示している。

リライキットではバージョンによりプローブ数が異なるので最新キットプローブ特異性に合わせデータ移動(昨年度の報告書を参照)を行い検体 (H1801-1806) ごとのグループにまとめて並び替えを行った。報告書のスペースの関係から、生データは参加施設に送付した CD-R のままで今回の報告書には記載を省略した。

表 1 SSO 法採用施設数(ルミネックス法を除く)

参加ラボ	72
回答ラボ	66
SSO法	49
Reli	23
Reli単独使用	17
MPH-2	5
イノリバ	2

3. ダイナルリライキットの分析

(1) リライキットを使用した施設は D-002, 003, 004, 009, 012, 015, 016, 021, 023, 024, 027, 030,

表2 Dynal Reli 生データ集計数(施設数)

検体	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DRB	HLA-DQB
H1801	22	22	5	22	4
H1802	22	22	5	22	4
H1803	22	22	5	22	4
H1804	22	22	5	22	4
H1805	20	21	5	21	3
H1806	20	19	5	21	3

031, 033, 043, 052, 054, 055, 060, 063, 066, 067, 072 の 23 施設で、本キット単独使用(太字で表示)は 16 施設であった。1 施設は生データを送付して来なかったので分析から除外した。

(2) 表2にリライキットのサンプルごとに HLA アリルの生データ解析数を示した。このことから SSO 法では通常の抽出 DNA 検体、少量の WGA 検体、ろ紙サンプルにも十分に対応できることを示している。また解析アリルが HLA-A, B, DRB に多いことは日常の検査項目を反映していると考えられる。

(2) HLA-A 座について

22 施設が解答を寄せた。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 2, 41 プローブキット使用施設が 1, 43 プローブキット使用施設が 19 であった。新しい 43 プローブキット使用が増加しているが、相変わらず古いキットを使用し続けている施設もあり、販売時のキットサイズが大きく、日常の検体が少ないことを示していると考えられた。

A 座では全般的に陽性プローブ、陰性プローブに対して良好な反応を示した。H1806 検体については偽陰性のプローブ反応が一部の施設で見られたが、PCR 増幅がうまく行われなかった可能性を示している。このことは試料として送られたろ紙から各施設が抽出をした DNA に何らかの問題があることを示唆するものである。

全般的に陽性コントロールの反応がスコアー 1 や 2 などの施設が多く認められた。このことは元来キットのライン状に結合してあるプローブ量が少なく、洗浄発色過程などで施設間での差異が大きく出

たのか、反応の強さを判定する側の基準の相違によるものか考えられる。

一部の施設では反応パターンから解答として表記されたアリルの特異性が正確には決められないようなケースも認められた。転記ミスや他法のデータを参照した可能性がある。

アリルの記載方法については、一部では未記入だったり学会が提唱する標準的な方法とは異なったりする施設が認められた。

(3) HLA-B 座について

B 座用のキットでは 22 施設が 62 プローブキットを使用していたが、残りの 2 施設では 56 プローブキットを使用していた。全般的に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。D-030 の施設では H1802 および H1806 検体で B*1302 の取り漏れが生じた。56 プローブを使用した施設では B*1512/19 の検体について B*1501 との区別が付かない結果であった。読み替えでは前者が B76 であるのに対して B62 ととるので 2 桁レベルの区別ができないことになる。

(4) HLA-C 座について

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。生データは各施設ともほぼ一致し、アリルの結果は H1801, H1803, H1805 で一致していた。H1802, H1804, H1806 の検体では 2 桁レベルのアンビギュイティが存在していた。

(5) HLA-DRB について

プローブ数 54 のキット使用施設が 18, 45 プローブキット使用施設が 4 であった。昨年に比較すると記載する施設が増加したが、相変わらず DRB1 のアレル報告はしていても DRB3-5 遺伝子の結果報告をしない施設が認められた。このことは解析ソフトを使用した場合に DRB1 アレルについては可能性のある組み合わせを表示するが DRB3-5 アレルについては詳細を表示しないのでマニュアル判定になるためと考えられる。アレル報告も空欄や、4 桁レベルのアンビグイティ報告ではなく 2 桁レベルの報告をした施設が認められた。D-027 の施設ではアレルの表記法が正しく行われていなかった。

H1801 の検体について生データの反応値はほぼ全施設で一致した。HLA 型(血清対応型, 読替型)が正解であるのにも拘わらず解答アレル表記は多様であった。解析ソフトが施設間で異なるためと考えられる。

H1802 検体では DRB4 アレルについて同じ特異性を 2 つ記載している施設が多いが、DRB1 アレルが 2 つあっても DRB4 アレルについては同じ特異性であれば片方のみを記載して、一方はブランクとすべきものと考えられる。

H1803 検体は昨年の H1702 検体と同一検体であった。DRB1*1501 と DRB1*1502 がリライのジェネリック増幅 DRB キットでは判定できず、DRB1*1502 と判定しているところは DRB5*0102 の連鎖不平衡から判定していると考えられた。昨年同様に 1 施設では DRB1*1502 が含まれないアレル記載をしていた。

H1804 の検体は H1802 と H1806 と同一の細胞株由来の検体であり、WGA を行った産物として配布されたものであった。生データの反応値はほぼ一致していた。

H1805 の検体は H1801 と同一の検体であり、ろ紙付着細胞として配布されたものである。各施設とも生データはほぼ一致していた。むしろ H1801 検体よりも反応値はきれいに分かれている印象がある。

H1806 の検体は H1802 と H1804 と同一の細胞株由来の検体であり、ろ紙付着細胞として配布されたものであった。各施設の生データはほぼ一致して

いた。プローブ #36 では非特異的な反応が見られやすいので弱く発色したものは陽性には取らないなど注意する必要がある。

今回の QCWS ではヘテロザイゴウトの検体が少なく、ジェネリックな増幅をかけて判定する上であまり困難がなかったが、通常のヘテロザイゴウトの検体ではアレル数が増加すると DRB1 遺伝子、DRB3-5 遺伝子、DR2 関連イントロンなどの遺伝子産物が対象となるのでアレル特異性の判定に困難が生じてくる。すでに DR52 関連遺伝子では DRB1 と DRB3 遺伝子の類似性から様々な組み合わせが考えられるが、現時点でも DR52 関連抗原が重複したような時には適切に DRB1 遺伝子のみを増幅する必要があるだろう。

(6) HLA-DQB1 について

D-004, 016, 024, 027 の 4 施設が参加した。プローブの反応は各々の施設でよく一致していた。D-027 の施設では生データの記載やアレル表記のルールが守られていなかった。

(7) リライキットのまとめ

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) 通常の DNA 検体であれ、WGA 産物であれ、ろ紙付着細胞サンプルであれ、十分に対応することが可能であった。

3) HLA 型(血清型)への読替には問題がないが、最終的なアレルの記載では施設間(判定者)にバラツキが認められた。最新のアレル情報に対応した解析ソフト使用が望まれる。

4. ワクナガ MPH-2 キットの分析

(1) MPH-2 キットを使用した施設は D-017, 035, 045, 048, 070 の 5 施設であった。昨年の 9 施設と比較してほぼ半減していた。

(2) 従来同様に生データの報告桁数が OD 値, 100 倍 OD 値とあり、スコア化データへの変換が行われていないためにプローブの陽性, 陰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

は判定できない状況であった。このことはマイクロプレートを用いた MPH 法での反応、洗浄や温度管理などの難しさの表れと考えられる。

5. INNO-LIPA キットの分析

このキットを使用した施設は D-017 と 064 の 2 施設であった。DR のみの参加や他法との併用であり、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。本キットの原理はリライと同様にプローブ数も多く、結果報告の精度も同等であった。

6. SSO キットを使いこなすために

QCWS では検体の送付がすでに抽出された DNA の形状として、あるいは抽出するとしてもろ紙からの抽出方法が限られているために、テンプレート DNA 自体の量や質という面ではあまり問題になることはない。しかし各施設が血液などから抽出した DNA の質が悪ければ PCR 反応が全くかからないこともあるし、対立遺伝子の片方がうまく増幅できないこともある。質がよければ少量であっても WGA を利用して増幅し、さらに SSO キットを用いてタイピングすることも可能である。市販 SSO キット

では多様な DNA サンプルからでも PCR 反応が十分に増幅されるようにプライマーの工夫やプロトコルの充実が諮られている。プローブとの反応では時間、温度管理や試薬の調整が守られれば大きな失敗はない。問題は各プローブの発色反応を陽性と取るか陰性と取るかである。いくらメーカー側が使用するプローブの長さや量を調整したキットであっても強く出るプローブ、弱く出るプローブ、他の特異性に対して多少の交差が出やすいプローブなど存在する。この点では QCWS の意義として他の施設がどのようなスコア判定しているかが非常に参考となる。世界標準となっているキットでは日本人の特異性では反応しないプローブがあり、人種の違う HLA 検体では思わぬところに擬陽性反応が出るようなことがある。私たちは様々な特異性のテストを経験することで精度を向上させることができる。QCWS では DNA を取り扱うことから倫理委員会の承認があるのが現状である。QCWS での DNA 検体の取り扱い、一般の研究とは異なるもので、タイピングの精度管理として倫理委員会での制約が小さくなることを期待するものである。

第 10 回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) — 方法論別データ検討報告 (いわゆる Luminex 法) —

丸屋悦子, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. はじめに

第 9 回 QCW に比べ今回は Luminex 法を使用し

た施設の増加が見られた(表 1)。解析ポイントを施設別・キット別での総合精度評価にしぼった。

表1 使用キット別参加施設一覧

施設名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Total	
	D005	D007	D010	D013	D014	D019	D020	D025	D029	D032	D034	D036	D040	D042	D044	D047	D056	D058	D068	D069		
★	○	○	○			○	○	○			○	○	○		○		○	○				12
◆	○											○	○		○	○	○					6
▲				○	○	○			○	○		○		○					○	○		9

2. 評価方法

1) PCRの増幅効率と精度(増幅領域を過不足なく増幅する)

2) プローブの反応性(実験条件の整備状況の把握)

上記2点について、使用されたHLA-typing kitは3社(★・◆・▲)、これらのkitを用いて提出された生データを解析し、総合的な評価を試みた。

3) 配布DNA6種のHLA typing (A, B, C, DR) 判定結果の比較

今回配布された6種のDNAは3種の細胞由来(H1801 = H1805, H1802 = H1804 = H1806, H1803)である。参加施設を使用kit別に分類し、kit別の判定結果を表2-5に示す。

2-1. HLA-A 座

問題点: DNA H1802 = H1804 = H1806 の判定で、★キット使用施設においてA2アレルの判定に不一致(25%)があった。日本人においてA2アレル多型の正確なタイピングは必須であり注意を要する。

2-2. HLA-B 座と C 座

参加施設の回答に表記方法など多少の違いはあるが、根本的な問題点と考えられる相違はなかった。

2-3. HLA-DR 座

問題点その1: DNA H1803の判定で★キット使用の1施設において一方の抗原検出ができなかった。陽性コントロールの蛍光値は他施設とほぼ同程度で問題はなかった。このような過誤を起こす原因のひとつとしてハイブリダイゼーション温度調節不良が考えられる。各プローブにはそれぞれ最適なハイブリダイゼーション温度があり、多数のプローブを同

一のハイブリダイゼーション温度(最大公約数の温度)でおこなうキットでは正確な温度管理が重要と考えられる。

問題点その2: DNA H1801 = H1805 の判定で▲キット使用の4施設(44%)で抗原レベルの不一致があった。原因の特定は困難であったが、他キットを使用した施設の判定結果からも、この4施設にはなんらかの問題があったと考えられる。

3. 施設別総合評価

表6に施設別総合評価を示す。評価項目はPCR精度とHybridization法の精度を用いた。

【PCR精度】

HLA-class Iの場合、exon 2と3を増幅し、タイピングに用いる。多型を検出するprobeは両領域に散在し、senseまたはanti-senseの塩基配列をターゲットとする。ゆえに増幅は両exonとそれぞれのsense, anti-senseがバランス良くおこなわれることが必須である。バランスの良いPCRをおこなう技術が精度の高さに反映される。増幅効率のバランス(R)を以下の計算式で求め、各施設に得点を与えた。

$$R = (\text{exon 2 positive control (PC) の蛍光値}) / (\text{exon 3 PC の蛍光値})$$

各exonのsense, anti-senseに対するpositive controlを有するキット(精度管理をおこなうために非常に有用なコントロールである)は以下の二通りの計算式により、R, Rex2, Rex3を求めた。

$$R = (\text{exon2 (sense PC + anti-sense PC)} / \text{exon3 (sense PC + anti-sense PC)})$$

$$\text{Rex2} = (\text{exon2 sense PC} / \text{exon2 anti-sense PC})$$

$$\text{Rex3} = (\text{exon3 sense PC} / \text{exon3 anti-sense PC})$$

R, Rex2, Rex3の値が0.8-1.2 = 5点, 0.49 <

表2 HLA-A 座判定結果一覧

HLA-A locus	H1801		H1802		H1803		H1804		H1805		H1806			
	使用キット	#	LoI	核酸コード	HLA型	DNA型	HLA型	DNA型	HLA型	DNA型	HLA型	DNA型		
★	1	3	1	8 D007	A2	A*02:01	A*3001:01L02+	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L04+	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	2	J3	1	8 D010	A2	A*02:10	A*3001:01M02+	A203 A29	A*02:10	A*3001:01M08+	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	3	7	1	8 D019	A2	A*02:03	A*3001:02D04+	A2 A29	A*02:03	A*3001:02D07+	ND	A*02:03	A*3001:02E1+	
	4	7	1	8 D020	A2	A*02:03	A*3001:02D04+	A2 A29	A*02:03	A*3001:02D04+	ND	A*02:03	A*3001:02E1+	
	5	7	1	8 D025	A2	A*02:03	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:03	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:03	A*3001:01L15	A210 A30
	6	3	1	8 D034	A2	A*02:10	A*3001:01L02+	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L04+	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	7	3	1	8 D040	A02	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	8	3	1	8 D044	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A2 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	1	F1	1	8 D005	A2	A*02:03	A*3001	A2 A29	A*02:03	A*3001	A2 A30	A*02:03	A*3001	A2 A30
	2	F1	1	8 D036	A2	A*02:10	A*3001	A203 A29	A*02:10	A*3001	A210 A30	A*02:10	A*3001	A210 A30
	3	E3	1	8 D040	A02	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	4	E6	1	8 D044	A2	A*02:10	A*3001	A2 A29	A*02:10	A*3001	A210 A30	A*02:10	A*3001	A210 A30
	5	F04	1	8 D047	A2	A*02:10	A*3001	A203 A29	A*02:10	A*3001	A210 A30	A*02:10	A*3001	A210 A30
	6	E3	1	8 D056	A2	A*02:10	A*3001	A203 A29	A*02:10	A*3001	A210 A30	A*02:10	A*3001	A210 A30
▲	1	14	1	8 D013	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	2	13	1	8 D014	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	3	14	1	8 D029	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	4	14	1	8 D032	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	5	14	1	8 D036	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	6	14	1	8 D042	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	7	14	1	8 D068	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	8	14	1	8 D069	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	1	14	1	8 D013	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	2	13	1	8 D014	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	3	14	1	8 D029	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	4	14	1	8 D032	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	5	14	1	8 D036	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
	6	14	1	8 D042	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30
7	14	1	8 D068	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	
8	14	1	8 D069	A2	A*02:10	A*3001:01L15	A203 A29	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	A*02:10	A*3001:01L15	A210 A30	

配列DNAの由来番号は3種、H1801 = H1805 ; H1802 = H1804 = H1806 ; H1803
 他の施設と判定が異なり、相違がかなり重要と考えられる場合

表3 HLA-B 座判定結果一覧

HLA-B Typing 使用キット	lot	海抜コード	H1801		H1802		H1803		H1804		H1805		H1806	
			DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型		
★	1	3JPN 18D005	B*4501/03/05/07	B*1302/08	B*4006	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006	B*4501/03/05/07	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
	2	10 18D007	B*4501/03/04/+	B*1301/02/08	B*4004/06/53	B*0705/06	B*1512/19	B*1301/02/08	B*4004/06/53	B*4501/03/04/+	B*1301/02/08	B*4004/06/53	判定不能	B*4006/53
	3	3JPN 18D010	B*4501/03/07	B*1302/08	B*4006/53	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006/53	B*4501/03/07	B*1302/08	B*4006/53	B*1302/08	B*4006/53
	4	9 18D020	B*4501/03/04/+	B*1301/02/07/+	B*4004/06/53	B*0705/06	B*1512/19	B*1301/02/07/+	B*4004/06/53	B*4501/03/04/+	B*1301/02/07/+	B*4004/06/53	B*1301/02/07/+	B*4004/06/53
	5	9 18D025	B*4501/03/04/+	B*1301/02/07/+	B*4004/06/53	B*0705/06	B*1512/19	B*1301/02/07/+	B*4004/06/53	B*4501/03/04/+	B*1301/02/07/+	B*4004/06/53	B*1301/02/07/+	B*4004/06/53
	6	3JPN 18D034	B*4501/03/04/+	B*1302/08	B*4006/53	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006/53	B*4501/03/04/+	B*1302/08	B*4006/53	B*1302/08	B*4006/53
	7	3JPN 18D040	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006/53	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006/53	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006/53	B*1302/08	B*4006/53
	8	3JPN 18D044	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006/53	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006/53	B*4501/03/04/+	B*1302/08	B*4006/53	B*1302/08	B*4006/53
	9	3JPN 18D058	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006/53	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006/53	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006/53	B*1302/08	B*4006/53
◆	1	F001B 18D005	B*4501/03/05/07	B*1302/08	B*4006	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006	B*4501/03/05/07	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
	2	F001B 18D036	B*4415/4501/+	B*1302/08	B*4006	B*0705/46/53/+	B*1501/12/14/+	B*1302/08	B*4006	B*4415/4501/+	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
	3	F001B 18D040	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*0705/06	B*1501/12/14/+	B*1302/08	B*4006	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
	4	F0038 18D044	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*0705/06	B*1501/12/14/+	B*1302/08	B*4006	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006/53
	5	F001B 18D047	B*4415/4501/+	B*1302/08	B*4006	B*0705/06/46/05	B*1501/12/14/+	B*1302/08	B*4006	B*4415/4501/+	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
	6	F0038 18D056	B*4415/+	B*1302/08	B*4006	B*0705/+	B*1501/12/14/+	B*1302/08	B*4006	B*4415/+	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
▲	1	0 1 4 18D013	B*45	B*1302/08	B*4006	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006	B*45	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
	2	s 1 3 18D014	B*4501/03/05/07	B*1302/08	B*4006	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006	B*4501/03/05/07	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
	3	o 0 9 6 18D019	B*4501/04	B*1302	B*4006/27/18	B*0705/06/08/+	B*1501/12/14/+	B*1302	B*4006/27/18	B*4501/04	B*1302	B*4006/27/18	B*1302	B*4006/27/18
	4	0 1 4 18D029	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
	5	0 1 4 18D032	B*4501	B*1302	B*4006/01/01	B*0705	B*1512	B*1302	B*4006/01/01	B*4501	B*1302	B*4006/01/01	B*1302	B*4006/01/01
	6	0 1 4 18D036	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
	7	0 1 4 18D042	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
	8	0 1 4 18D058	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006
	9	0 1 4 18D069	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*0705/06	B*1512/19	B*1302/08	B*4006	B*4501/03/05/+	B*1302/08	B*4006	B*1302/08	B*4006

配布DNAの由来組織は3重、H1801 = H1805 : H1802 = H1804 = H1806 : H1803

表 4 HLA-C 座判定結果一覧

HLA-C 使用キット	No 16	Lot	施設コード	H1801		H1802		H1803		H1804		H1805		H1806		
				DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型			
★	1	6	18D007	Cw*1601/08	-	Cw*0602/09/10/+	Cw*0801/08/11	Cw*0403	Cw*1505/06/09	Cw*0602/09/10/+	Cw*0801/08/11	Cw*1601/08	Cw*0602/09/10/+	Cw*0801/08/11	Cw*0602/09/10/+	
	2	5	18D010	Cw*1601	-	Cw*0602/10/12/+	Cw*0801/08	Cw*0403	Cw*1505/06/09	Cw*0602/10/12/+	Cw*0801/08	Cw*1601	Cw*0602/10/12/+	Cw*0801/08	Cw*0602/10/12/+	
	3	6	18D020	Cw*1601	-	Cw*0602/09/10/+	Cw*0801/08/11	Cw*0403	Cw*1505/06/09	N.D.	N.D.	Cw*1601	Cw*0602/09/10/+	Cw*0801/08/11	Cw*0602/09/10/+	
	4	5	18D025	Cw*1601	-	Cw*0602	Cw*0801	Cw*0403	Cw*1505/09	Cw*0602/09/10/+	Cw*0801/08/11	Cw*1601	Cw*0602/09/10/+	Cw*0801/08/11	Cw*0602/09/10/+	
	5	3	18D040	Cw*1601	-	Cw*0602/09/12/+	Cw*0801/08/11	Cw*0403	Cw*1505	Cw*0602/09/12/+	Cw*0801/08/11	Cw*1601	Cw*0602/09/12/+	Cw*0801/08/11	Cw*0602/09/12/+	
◆	1	FO01	18D040	Cw*1601	-	Cw*0602/09/12/+	Cw*0801/08/11	Cw*0403	Cw*1505	Cw*0602/09/12/+	Cw*0801/08/11	Cw*1601	Cw*0602/09/12/+	Cw*0801/08/11	Cw*0602/09/12/+	
	2	FOA	18D044	Cw*160101	-	Cw*0602/07/09	Cw*0801/08	Cw*0403	Cw*1505	Cw*0602/07/09	Cw*0801/08	Cw*1601/06	Cw*0602/07/09	Cw*0801/08	Cw*0602/07/09	
	3	FOA	18D047	Cw*1601	Cw*1601/06	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0403	Cw*1505	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*1601	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0602/07/09/+	
	4	FO01	18D056	Cw*1601	Cw*1601/06	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0403	Cw*1505	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*1601	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0602/07/09/+	
▲	1	14	18D013	Cw*1601/06	-	Cw*06	Cw*08	Cw*0403	Cw*1505	Cw*06	Cw*08	Cw*1601/06	Cw*06	Cw*08	Cw*06	
	2	10	18D019	Cw*160101	-	Cw*0602/09/11	0801/08/10/+	Cw*0403	Cw*1505	Cw*0602/09/11	Cw*0801/08/10/+	Cw*1601/06	Cw*0602/07/09/+	Cw*0602/07/09/+	Cw*0602/07/09/+	
	3	14	18D029	Cw*1601/06	-	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0403	Cw*1505	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*1601/06	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0602/07/09/+	
	4	14	18D032	Cw*160101	-	Cw*0602	Cw*080101	Cw*0403	Cw*150501	Cw*0602	Cw*080101	Cw*160101	Cw*0602	Cw*0602	Cw*080101	Cw*080101
	5	14	18D036	Cw*1601/06	-	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0403	Cw*1505	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*1601/06	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0602/07/09/+	
	6	14	18D042	Cw*1601/06	-	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0403	Cw*1505	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*1601/06	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0602/07/09/+	
	7	14	18D068	Cw*1601/06	-	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0403	Cw*1505	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*1601/06	Cw*0602/07/09/+	Cw*0801/08/10/+	Cw*0602/07/09/+	

配布DNAの由来細胞は3種、H1801 = H1805 : H1802 = H1804 = H1806 : H1803

表6 施設別総合評価(第10回 QCW DNA 部門)

施設名	HLA-class I				HLA-class II				総合評価
	キット	PCR 精度	P/N	評価	キット	PCR 精度	P/N	評価	
D005	★	3.7	4.8	8.5	★	3.0	5.0	8.0	17.5(16)
	◆	4.8(4.2)	4.8	9.6(9)					
	総合	4.6(4.1)	4.9	9.5(9)					
D007	★	3.0	4.9	7.9	★	3.0	3.8	6.8	14.7
D010	★	3.2	4.8	8.0	★	3.2	4.8	8.0	16.0
D013	▲	3.6	4.7	8.3	▲	4.2	4.9	9.1	17.4
D014	▲	3.0	5.0	8.0	▲	4.8	4.9	9.7	17.7
D019	★	1.3	3.9	5.2	★	3.7	5.0	8.7	15.6
	▲	2.5	4.9	7.4	▲	4.8	4.3	9.1	
	総合	2.1	4.5	6.6	総合	4.3	4.7	9.0	
D020	★	3.4	4.2	7.6	★	4.7	4.6	9.3	16.9
D025	★	3.2	4.9	8.1	★	4.7	4.7	9.4	17.5
D029	▲	3.3	4.9	8.2	▲	5.0	4.9	9.9	18.1
D032	▲	3.2	5.0	8.2	▲	3.7	4.8	8.5	16.7
D034	★	3.6	4.8	8.4	★	4.6	4.6	9.2	17.6
D036	▲	3.2	4.9	8.1					18.1(17.8)
	◆	4.5(3.6)	4.9	9.4(8.5)					
	総合	3.7(3.4)	4.9	8.6(8.3)	★	4.7	4.8	9.5	
D040	★	4.4	4.7	9.1	★	3.5	4.6	8.1	17(16.7)
	◆	3.6(3)	4.7	8.3(7.7)	◆	4.2	4.7	8.9	
	総合	4.0(3.7)	4.7	8.7(8.4)	総合	3.7	4.6	8.3	
D042	▲	3.2	4.8	8.0	▲	4.5	4.9	9.4	17.4
D044	◆	3.6(3.5)	4.7	8.3(8.0)	◆	2.7	4.1	6.8	16.9(15.5)
	★	3.8	4.6	8.4	★	3.7	3.8	7.5	
	総合	3.7(3.3)	4.7	8.4(8.0)	総合	3.2	4.3	7.5	
D047	◆	4.4(4.1)	5.0	9.4(9.0)	◆	3.3	5.0	8.3	17.7(17.3)
D056	◆	3.4(3.0)	4.9	8.3(7.9)	★	3.3	5.0	8.3	16.6(16.2)
D058	★	3.3	1.0	4.3					評価不能
D068	▲	3.2	4.9	8.1	▲	4.7	4.9	9.6	17.7
D069	▲	2.8	4.9	7.7	▲	3.0	4.9	7.9	15.6
平均		3.4	4.6	8.0		3.9	4.7	8.6	17.0
SD		0.7	0.8	1.1		0.7	0.4	0.9	3.9

評価法

PCR精度： HLA-class Iの場合exon 2と3を増幅し、タイピングに用いる。probeは両方の領域に存在し、かつsense側またはanti-sense側をターゲットとしている。精度良い検査を行うには両方のexonがバランスよく増幅されかつ、各exonのsense、anti-senseの増幅もバランスが保たれていることが望ましい。PCRの精度を評価するため、exon2とexon3の陽性コントロール比を用いた〔sense、anti-senseに対するコントロールが含まれるキットは次の計算式を用いた：exon2 (sense+antisense)÷exon 3 (sense+antisense)〕。得られた比が0.8-1.2 =5点、0.49< >0.79=3点、1.21<>1.51=3点、それ以外を1点と得点を与えた。施設ごとに得点を計算し加算後、実施検体数で割り施設の得点とした。

Sense、anti-senseに対するコントロールがあるキットでは〔〕内に各exonのsenseとantisenseの比とexon2と3の比を総合評価した場合の得点を示している。

P/N： Hybridization法の評価のため、施設ごとのP/N〔計算法は前年度と同様、全検査検体で陽性と陰性を示したprobeが評価可能なprobeであり、(陽性と判定された蛍光値の最小値)÷(陰性と判定された蛍光値の最大値)=P/N〕値を算出し、P/N>4.9 =5点 1-4.9 =3点 1> = 1点と得点を与えた。施設ごとに評価できるprobeのP/Nの得点を加算し、平均値を得点とした。得点率が平均値以上を影塗りしている。

0.79 = 3点, 1.21 < 1.51 = 3点, それ以外を1点とした。施設ごとに検体ごとの得点を加算し, 実施検体数で割った得点を施設得点とした。表6の()内の得点は Rex2 と Rex3 を用いて計算した場合の得点である。Sense, anti-sense についてのコントロールがないキットと並べる場合は()外の数字が妥当である。正確な PCR 精度を評価するには sense, anti-sense それぞれに対する common probe (PC) を有するキットが望ましい。

HLA-class II の場合 exon2 の増幅産物のみを用いるため, 各キットともに PC は1種類である。よって同一キットを使用した施設の PC の蛍光値の平均値と各施設 PC の比 (R) を求め, $R > 1 = 5$ 点, $1 - 0.5 = 3$ 点, $0.5 > = 1$ 点と評価した。検体ごとの得点を加算し, 実施検体数で割った得点を施設得点とした。

【Hybridization 法の精度】

数多くの probe を同一の hybridization 温度でおこなうには, hybridization 温度の調節や洗浄技術などが検査精度を左右する因子である。総合的な影響が probe の反応性として現れる。いわゆる probe のメリハリぐわいを評価するため, 昨年同様 P/N 比を求め, $> 4.9 = 5$ 点, $1 - 4.9 = 3$ 点, $< 1 = 1$ 点とした。施設ごとに評価できる probe の P/N 比の得点を加算し, その平均値を施設得点とした。

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

表6の欄外に各施設の得点の平均値を示した。参加施設の半数以上が平均点を上回る良い成績であった。HLA-class I, II ともに Hybridization 法の精度は参加施設のほとんどが4点以上でほぼ問題はないが, PCR 精度は3点台の施設が多く, 今後の焦点は PCR の精度の向上と維持である。

4. キット別総合評価

表7にキット別総合評価を示す。評価方法は施設別の場合と同様の方法でおこなった。PCR 精度評価からはキットで使用されているプライマーの設計や PCR 条件設定の良・不良がわかる。Hybridization 法の精度評価から probe の設計や Hybridization 条件設定および実験の操作性の良・不良がわかる。HLA 座ごとの結果をまとめる。

HLA-A typing キット: 3種のキットのうちの2種(▲・◆)のキットが総合評価点9以上の良い成績であった。★キットも PCR 精度で4点に満たないものの総合得点は8以上, すべてのキットが優良である。

HLA-B typing キット: ◆のキットが最優秀で得点9以上, 他のキットは得点数が低く, 特に▲は PCR 精度を高める改良をお願いしたい。プローブの評価はすべてのキットで良好であった。

HLA-C typing キット: ▲・★キットが総得点数8以上で優秀, 特に▲キットは PCR 精度も Hybridization 法も4点を獲得しバランスの良いキットと考えられる。すべてのキットで probe の評価は4.8と優秀である。

HLA-DR typing キット: ▲キットが得点数9と最も優秀であり, PCR 精度も Hybridization 法も4点以上を獲得しバランスの良いキットと考えられる。すべてのキットで Hybridization 法の評価は4点以上を獲得し優秀であった。

5. まとめ

昨年の QC と比較し各施設の成績が向上し, キットとして問題となるものは無く良好な結果が得られた。来年度への目標は PCR 精度をより高める工夫と考えられる。来年も良い精度評価が得られることを期待する。

第10回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —方法論別データ検討 (SSP 法)—

小林 賢, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. はじめに

QC ワークショップが第6回大会から開催され、今回で10回目を迎えることになる。この間にアリルの数が増え、結果を判定するのにかなり苦慮するようになってきている。また、方法論についても PCR-RFLP 法から PCR-SSP 法にシフトしてきたが、このような観点から、これも PCR-SSO 法へと移行しようとしている。このような中で、今回の QC ワークショップにおける PCR-SSP 法がどのような結果になったのか述べることにする。

2. 解析結果

One Lambda 社製の JPN 以外のキット(表1, 2, 4, 5)については、どの施設においても反応性に問題となるような偽陽性反応や偽陰性反応がほとんど見られなかった。それに対し、JPN キット(表3)では少

数の施設であるが、偽陰性反応や偽陽性反応がかなり見受けられた。JPN は1組のプライマーセットでアリルを決定していることが多く、常にパーフェクトな反応性が要求されるキットである。言い換えれば、反応性の悪い DNA 溶液や Taq DNA ポリメラーゼなどを使用した場合に結果が異なることを意味している。今までも色々といわれていることであるが、方法論の異なる2種類以上の検査法で HLA アリルをタイピングすることが患者さん達の利益に繋がるということを理解していただけたらと思う。

PCR-SSP 法の反応性については、年々向上してきているものの、判定結果の記入法についてはほとんど改善されていないのが現状である。「DNA タイピング結果表記と HLA 型表記」を参照し、今後の参考にして正しい表記法で記入されることを期待する。

Table 4 Reactivity for the One Lambda Micro SSP Allele Specific HLA Class II (DQB1) Typing Tray

Lab #	Lot #	Sample #	1				2				3				4				HLA class II allele		
			F	E	D	C	B	A	D	B	A	D	B	B	A	D	B	B	HLA-DRB1	HLA-DRB3/B4/B5	HLA-DQB1
18D016	03A	H1801	1	1	1	1	1	1	1	1	8	8	1	8	1301/51				0603		
18D020	04A	H1801	1	1	1	1	1	1	1	1	8	8	1	8	1301/52/59	-	DRB3*0101/11		0603/26	-	
18D016	03A	H1802	8	8	8	8	1	1	1	1	8	1	8	1	0701/09	0901/04			0201	0303	
18D020	04A	H1802	8	8	8	8	1	1	1	1	8	1	8	1	0701/08	0901/03	DRB4*0103/04/05		0202	030302	
18D020	04A	H1803	1	1	1	1	8	8	8	1	1	1	1	1	100101	1502/14	DR5*0102/03		0501	0502	
18D016	004	H1804	8	8	8	8	1	1	1	1	8	1	8	1	0701/09	0901/04			0201	0303	
18D020	04A	H1804	8	8	8	8	1	1	1	1	8	1	8	1	0701/08	0901/03	DRB4*0103/04/05		0202	030302	
18D016	004	H1805	1	1	1	1	1	1	1	1	8	8	1	8	1301/51				0603		

Table 5 Reactivity for the One Lambda Micro SSP Generic HLA Class II Typing Tray

Lab #	Lot #	Sample #	1			2			3			4			HLA class II allele								
			E	E	D	G	E	D	C	B	A	H	G	F	E	B	HLA-DRB1	HLA-DRB3/4/5	HLA-DQB1				
18D022	#05A	H1801	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	1	1	DRB1*1301/02/03/+	-	N.T.	N.T.	DQB1*0601/02/03/+	-
18D057	004	H1801	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	1	1	DRB1*1301/02/03/+	-	DRB3*01/02/03	-	DQB1*0601/02/03/+	-
18D060	#05A	H1801	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	1	1	*1301/02/03/+	-	B3*01/02/03	-	*0601/02/03/+	-
18D022	#05A	H1802	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	DRB1*0701/02/03/+	DRB1*0901/02/03/+	N.T.	N.T.	DQB1*0201/02/03/+	DQB1*0303/06/12/+
18D057	004	H1802	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	DRB1*0701/03/04/+	DRB1*0901/02/03/+	DRB4*0101/02/03/+	-	DQB1*0201/02/03/+	DQB1*0303/06/12/+
18D060	#05A	H1802	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	*0701/03/04/+	*0901/02/03/+	B4*0101/02/03/+	-	*0201/02/03	*0303/06/12/+
18D022	#05A	H1803	8	1	1	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	DRB1*1001	DRB1*1501/02/03/+	N.T.	N.T.	DQB1*0501/02/03/+	-
18D057	004	H1803	8	1	1	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	DRB1*1001	DRB1*1501/02/03/+	DRB5*01/02	-	DQB1*0501/02/03/+	-
18D060	#05A	H1803	8	1	1	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	*1001	*1501/02/03/+	B5*01/02	-	*0501/02/03/+	-
18D022	#05A	H1804	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	DRB1*0701/02/03/+	DRB1*0901/02/03/+	N.T.	N.T.	DQB1*0201/02/03/+	DQB1*0303/06/12/+
18D041	05A	H1804	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	DRB1*0701/03/04/+	DRB1*0901/02/03	DRB4*0101/02/03/+	-	DQB1*0201/02/03	DQB1*0303/
18D071	005	H1804	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	DRB1*07	DRB1*09	DRB4*01	-	DQB1*02	DQB1*03
18D022	#05A	H1805	1	8	8	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1	1	1	DRB1*1301/02/03/+	-	N.T.	N.T.	DQB1*0601/02/03/+	-
18D022	#05A	H1806	1	1	1	8	8	1	1	1	1	8	1	1	1	1	1	DRB1*0701/02/03/+	DRB1*0901/02/03/+	N.T.	N.T.	DQB1*0201/02/03/+	DQB1*0303/06/12/+

第10回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門)

—方法論別データ検討 (SBT, RFLP)—

成瀬妙子, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. はじめに

Luminex 法の改良や普及によって効率よい遺伝子

型決定が行えるようになったことで, QC ワークショップにおけるその他の方法として前回採用され

表1 解析法の組み合わせ(単位:施設)

SBT単独	SSO+SBT	SSP+SBT	SSO+SSP+SBT	SSO+RFLP+SBT
3	4	1	1	1

表2 使用した SBT キット(単位:施設)

AlleleSEQR	8
Gene kit (VISIBLE)	1
SeCore (DYNAL)	2
自家製	1

ていた SSCP (single strand conformation polymorphisms) 法は姿を消し, SBT (sequencing based typing), RFLP (restriction fragment length polymorphisms) の2法のみ回答が寄せられた。本稿ではこれら各方法での解析結果についてまとめた。

2. SBT 法

2.1 概況

参加施設は全9施設で, クラス I が8施設, クラス II は9施設と, 昨年より1施設増加した。クラス I ではほとんどの施設が A, B, C 遺伝子にて採用していたが, クラス II では DRB1 遺伝子に集中しており, DRB1 以外の参加は1施設のみであった。

採用状況は全9施設のうち3施設が単独での使用で, 他は SSO (主に Luminex) 法との併用であった(表1)。試薬の使用状況を表2にまとめたが, 前年と比較すると自家製が3施設から1施設に減少した。また, AlleleSEQR は, 複数の会社から異なった時期に発売されていたもので, 表では1種として扱ったが, ロットは各施設ごとに異なっていた。

2.2 結果

各施設から寄せられた A, B, C, DRB1 遺伝子タイピングの解答を表3に示した。表記や記述については施設からの回答のままとした。表記上の問題を除いても, 各施設間で表記に多少の違いがみられるが, これは各施設で使用したキットや判定ソフトが異なっているため, 解析可能な塩基配列の位置や長さ, 組み合わせが異なることの反映である。

全体的にはほとんどのラボで4桁, 6桁レベルで

の対立遺伝子の同定(特定)を行っており, また一致率も高く, やはり SBT 法が他法と比して高精度な遺伝子型の同定に極めて有効であることが確認された。ただ, 今回2桁表記で assign をした施設がみられた。これは, SBT 法が塩基配列を直接認識できる唯一の方法であるという特性を活かしきれておらず, 非常に残念である。また, 濾紙サンプルについては前回同様, SBT に用いるに十分な DNA 量が得られず, PCR で増幅の増幅不良, 判定不能となったものが多くみられた。

HLA-B 遺伝子の H1803, H1804 での誤判定は同一の施設であるが, PCR 増幅産物の純度に問題があり波形の解析が困難であったことによる。この施設は SBT 単独でのタイピングを行っており, SBT 単独での遺伝子タイピングは困難とのコメントであったが, 単独で同様のキットを用いていた他施設では対立遺伝子の特定が問題なく行われていたことから, 方法論については問題ないと思われる。

RDB1 遺伝子での誤判定のあった施設は rSSO (reverse-sequence specific oligonucleotide) 法との併用であったが, rSSO でも誤判定となっていた。

3. RFLP 法

3.1 概況

RFLP 法への参加は前回より1施設減少し4施設となった。クラス II は DRB1 に3施設, DQB1 に2施設, DQA1 に1で, クラス施設 I は C 遺伝子に1施設のみの参加があった。ほとんどが他法, 特に SSO 法との併用で, 一部の遺伝子や組み合わせを識別するための部分的使用が多くみられた。試薬は全施設が自家製であった。

3.2 結果

参加数が少ないため解析を行うことが難しいが, 得られた回答は他方での結果とよく一致していた。ただし, 2つある対立遺伝子のうち1つのみをタイピングし, 片方のみの結果を解答欄にそのまま記入

表3 遺伝子タイピング解答(SBT法)

A

Lab.	H1801	H1802	H1803	H1804	H1805	H1806
18D004	0201,-				0201,-	
18D014	02010101,-	0210,300101	020301,290101	0210,300101	判定不能	0210,300101
18D018	*020101,*020101	*0210,*3001	*0203,*29	*3001,nd	*020101,*020101	増幅不良
18D019-2	020101,-	0201/06/10/+,3001/08	020301,290101	判定不能	判定不能	判定不能
18D019-3	020101,-	0201/06/10/+,3001/08	020301,290101	判定不能	020101,-	0201/06/10/+,3001/08
18D020	020101,-	0210,300101	020301,290101	N.D.	020101,-	0210,300101
18D032	02010101,-	0210,300101	020301,290101	判定不可		
18D044	020101,-	0210,300101	020301,290101	0210,300101	not define	not define
18D062	*020101,-	*0210,*300101	*020301,*290101	*0210,*300101	*020101,-	*0210,*300101

B

Lab.	H1801	H1802	H1803	H1804	H1805	H1806
18D004	4501,-				4501,-	
18D014	4501,-	1302,40060101	0705/06,1519	1302,40060101	判定不能	1302,40060101
18D018	*4501,*4501	*1302,*4006	*07,*05	*0602,*0801	増幅不良	増幅不良
18D019-2	4501,-	1302,4006	0705/06,1519	判定不能	4501,-	判定不能
18D019-3	4501,-	1302,4006	0705/06,1519	1302,4006	4501,-	判定不能
18D020	4501,-	1302,400601	0705/06,1519	1302,400601	N.D.	1302,400601
18D032	4501,-	130201,40060101	070501,1519	130201,40060101		
18D044	4501,-	1302/14/,4006/53	0705/06,1519	1302/14/,4006/53	not define	not define
18D062	*4501,-	*1302,*400601	*0705/06,*1519	*1032,*400601	*4501,-	*1032,*400601

C

Lab.	H1801	H1802	H1803	H1804	H1805	H1806
18D014	1601,-	0602,080101	0403,1505	0602,080101	判定不能	0602,080101
18D018	*1601,*1601	*0602,*0801	*0403,*1505	*0602,*0801	*1601,*1601	*0602,*0801
18D019-1	1601,-	0602,0801	0403,1505			
18D019-3	160101,-	0602/09/11,0801	0403,1505	0602/09/11,0801	160101,-	0602/03/07/+,0801
18D020	1601,-	0602/09/11,0801/11/10	0403,1505	0602/09/11,0801/10/11	160101,-	0602/09/11,0801/10/11
18D032	160101,-	0602,080101	0403,150501	0602,080101		
18D044	160101,-	0602/09/11,0801/10/11	0403,150501/02/03	0602/09/11,0801/10/11	not define	not define
18D062	160101,-	0602/09/11,0801/10/11	0403,1505	0602/09/11,0801/10/11	160101,-	0602/09/11,0801/10/11

DRB1

Lab.	H1801	H1802	H1803	H1804	H1805	H1806
18D004	1301,-				1301,-	
18D014	130101,-	070101,090102	100101,150201	070101,090102	130101,-	070101,090102
18D018	*130101,*130101	*0701,*090102	*100101,*150201	判定不能	*130101,*130101	*0701,*090102
18D019-3	130101,-	0701/05,0901	100101,150201	判定不能	130101,-	0701/05,0901
18D020	130101,-	070101,090102	100101,150201	0701,090102	130101,-	070101,090102
18D028	*1301/02/16/67,-	*0701,*0901	*1001,*1502	*0701,*0901		
18D032	130101,-	070101,090102	100101,150201	070101,090102		
18D044	130101,-	070101,090102	100101,150101	070101,090102	not define	not define
18D062	*130101,-	*0701,*090102	*100101,*150201	*0701,*090102	*130101,-	*0701,*090102

: 誤判定

していた施設があったが、報告としては不十分であり、もう片方を nd 等で表す必要があろう。

4. まとめ

SBT法は4桁、6桁レベルでの遺伝子型同定を高精度で行える、きわめて有効なタイピング法である。

また、RFLP法は一部の制限酵素を選択的に用いることで、必要な部分のみをピンポイントでタイピング可能な、実用的なタイピング法であることはすでに明らかである。これらの特性を活かして日常検査に応用して頂きたい。

第10回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —テーマ別検討 (WGA)—

安波道郎, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. はじめに—全ゲノム増幅法 (WGA) について

ヒトゲノム多様性に関する情報が急速に蓄積され, また様々な局面でその情報を有効に利用できるようになってくるに伴って, 比較的稀少な DNA サンプルからもできる限り多数の遺伝子型決定を行なうことが要請されるであろう。このような事態に対応するために, 近年いくつかの全ゲノム増幅 (Whole Genome Amplification, WGA) の方法が開発され, その有用性が広く認知されている。以下に, そのうちの代表的な方法について概略を述べる。

当初, PCR 法を応用してゲノム DNA を鋳型とし, ランダムな配列をもつプライマーを用いることで全ゲノムを増幅することが試みられた。原理的にはほぼ同じであるが, プライマーの設計や反応条件が若干異なる「DOP-PCR」法, 「PEP」法, 「I-PEP」法と名づけられた方法が知られている。これらのいずれも方法でも概ね良好な結果が得られていたが, 遺伝子座位による増幅の偏りの存在や全般的に増幅産物の断片長が小さいため増幅した DNA を用いて比較的長い遺伝子領域を単離するのが困難である等の問題を伴うことが知られていた。

バクテリオファージ $\phi 29$ に由来する DNA ポリメラーゼは一定温度下に鋳型 DNA から次々に新しい DNA 鎖を繰り返し合成する特性があり, 近年この特性を応用した「Multiple displacement amplification (MDA)」法によって上記の PCR 法を応用した増幅法に伴う欠点はかなり克服され, その産物は種々

の遺伝子型決定法に用いられている。2006 年現在, メーカー 2 社からキットが発売されており, また $\phi 29$ DNA ポリメラーゼ単体も別のメーカーから入手できる (表 1)。

また最近, 鋳型 DNA に特異的な配列を連結してライブラリー化して, その連結した配列をプライマーとした PCR で全ゲノムを増幅する方法 (商標名「OmniPlex テクノロジー」) を応用したキットも発売され (表 1), この方法でも以前問題となった遺伝子座位による増幅の偏りはかなり改善されたとされている。

過去数回の HLA-QC ワークショップでは, ろ紙付着試料からの DNA タイピング法の可能性を課題の一つとしてきたが, 前回 (第 9 回) HLA-QC ワークショップにおいて, 参加施設の中でろ紙付着細胞試料について WGA を施行し良好な結果を得たとの報告があった。今回の第 10 回 HLA-QC ワークショップでは, ろ紙付着細胞試料とともに, ろ紙付着細胞試料についてコントロールラボで WGA を施行した試料を供給し, WGA のタイピング精度への影響を検討することとした。

2. サンプル調製について

ろ紙付着細胞試料には, 第 9 回と同じく Whatman 社 FTA カードを用いた。サンプル ID, H1802, H1804, H1806 はいずれも, ある一つの細胞株由来のものであり, これらのサンプルのタイピング

表1 入手可能な WGA 用試薬

製品	商品名	メーカー
(キット)		
MDA による WGA キット	GenomiPhi	GE ヘルスケア
MDA による WGA キット	REPLI-g	Qiagen
OmniPlex による WGA キット	WGA キット	Sigma-Aldrich
(酵素単体)		
φ29DNA ポリメラーゼ England Biolab	(同左)	New
φ29DNA ポリメラーゼ Fermentas	(同左)	
φ29DNA ポリメラーゼ	RepliPhi	AR ブラウン

表2 比較対象となるサンプル

サンプル ID	形態	調製
H1802	DNA 溶液	細胞株ペレットを SDS-proteinase K 処理、フェノール抽出、イソプロパノール沈殿（塩析）後、緩衝液に溶解
H1804	WGA 産物	H1806 と同時に作製したろ紙片より Qiagen 社のキット REPLI-g を使用して増幅
H1806	ろ紙付着細胞	培養細胞株懸濁液を Whatman 社 FTA カードに滴下後風乾

結果を比較することで WGA の有効性と問題点を検討可能と考えられた(表2)。

WGA 産物である H1804 は、次のようにして調製した。H1806 と同時に並行して作製したろ紙試料から 12 片を打ち抜き、キットのプロトコール記載のスケールで 12 本独立に WGA 反応を施行後、それぞれをアガロースゲル電気泳動で増幅を確認し(図1の右側にその一部を示す)、それら全体をプールした。DNA の濃度は、アガロースゲルでの蛍光染色強度から推定した。また、この DNA から HLA-B 座位の約 2 kb の断片が増幅できることを、(現在は供給中止となっている)ABI 社の HLA-B の SBT キットを用いて確認した(図2)。そののちに、配布用容

器に分注し、各施設へ発送直前まで冷蔵保存した。

3. 各参加施設での WGA 施行状況

各参加施設から提出されたデータのコメント欄に WGA 施行の記載があることをもって、WGA 施行状況を把握した(表3)。WGA 施行の報告は 64 のデータ提出施設中 4 施設 (6.25%) であった。うち 1 施設は配布した 6 種類のサンプルすべてについて WGA 施行後にタイピングを行ったとのことで、この施設の H1804 については、サンプルが WGA 産物であることは伏せられていたため、図らずも一般的には推奨されていない複数回繰り返して WGA を施行した産物のタイピングとなっている。

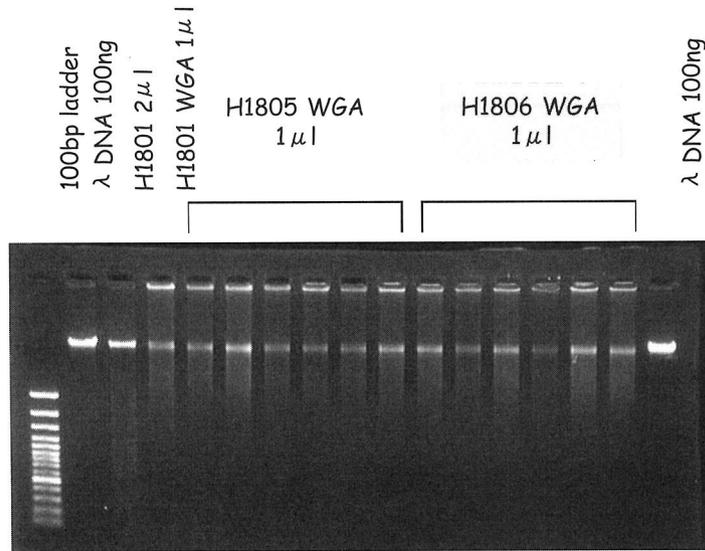


図1 WGA産物の電気泳動像

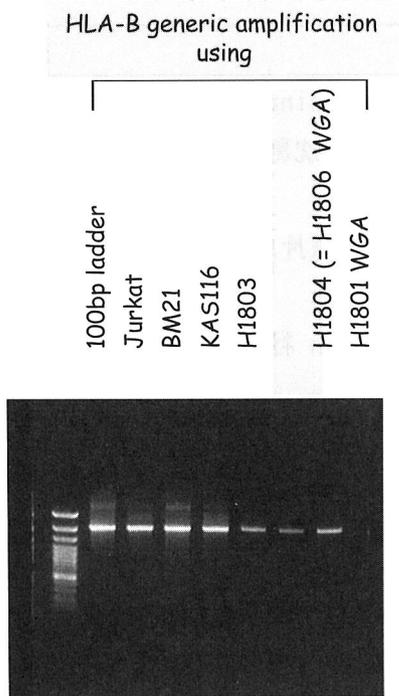


図2 HLA-B 座位の約 2kb の断片の PCR によるクオリティーチェック

イマーの反応性についての詳細は、方法論別解析のそれぞれの項に示されるように、若干の相違があつて型判定に際しては、何らかの調整が必要と考えられた。今回の比較は単一の細胞株に由来するものであるので、それが WGA 全般にあてはまるものであるか否かには、複数の異なるサンプルのデータを集積する必要がある。

一件であるが、奇異に思われる報告があつた。Dynal 社の rSSO キットのみを用いて判定しているが、コメント欄に「HLA-B では H1802, H1806 でもう 1 つアレルが存在すると思われませんが陽性バンドのパターンが一致しないため 1 アレル報告のみ」との記載があり、B*13 アレルを落としている。しかし、H1804 のサンプルでは B*13 の見落としではなく、WGA サンプルでの判定のほうがむしろ正解に近い結果となっている。この結果から WGA をした方が通常の DNA 検体を用いるよりも良いと判断するのはあまりに短絡的であり、この施設の判定については生データの解釈に問題があると思われる。

4. WGA のタイピング判定への影響(コントロールラボでの増幅産物)

ほとんどの施設で H1802 と H1804 の型判定結果に不一致はなく(総合判定の項を参照)、WGA に内在する問題はないと言える。個々のプローブ、プラ

5. WGA のタイピング判定への影響(参加施設での増幅産物)

4 参加施設での WGA については、必ずしもすべてが良好な結果とはなっていない。特にある程度の DNA 量を必要とする SSP 法を採用している 2 施設

表3 WGA 実施状況(報告例のみ)

WGA の報告	方法 (使用キット)	施設数 (64 施設中) *
あり		4
(内訳)	GenomiPhi	3
	REPLI-g	1
	PCR-based (OmniPlex を含む)	0

* : コントロールラボを除く

の場合、それぞれ異なる WGA キットを採用しているにもかかわらず、H1806 のクラス I のタイピングに失敗している。他の方法論を用いて判定する際には大きな問題はなさそうである。しかしながら、「H1805 と H1806 はろ紙をプロトコールに従い処理した後、GenomiPhi DNA Amplification Kit にて増幅した DNA を用いた。H1804 については、A*0210 は A*300101 と比較して増幅が弱く、B*400601 は B*1302 と比較して増幅が弱い。H1806 については、B*400601 は B*1302 と比較して増幅が弱い。」などのコメントがあるように、アレル間で均等に増幅

されるかという問題については、十分に注意を払う必要がある。

6. 総括

WGA は稀少なサンプルを取り扱う上で極めて有用な方法であり、型判定に際して概ね問題となることはないが、方法論によっては致命的な過ちに導かれる危険を伴うことに留意が必要である。増幅産物の量を吸光度で測定すると過大に見積もることになる。何らかの方法で増幅産物のクオリティーをチェックすることも必須である。

第 10 回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —テーマ別検討(ろ紙サンプル)—

太田正穂, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. はじめに

今日、DNA 多型検査が血液を使わなくても簡便かつ正確に行えるキットが多くの会社から発売されている。特にろ紙に添付した微量な血液から DNA を

抽出する方法は、サンプルの保存、他施設への輸送、DNA 抽出の簡便性などの利点からその用途が広く多分野で利用されている。HLA 検査においてもこの手法は貢献度が高いと考えられ、この3年間ろ紙サン

プルからのタイピングについて検討してきた。

本年度も、昨年度使用した製品と同じWhatman社製のFTAカードを用いたHLA-DNAタイピングの解析を行った。ワークショップの手順は昨年と似て、細胞(3×10⁵個)を附着しカードを参加施設に送付し、HLA-DNAタイピングを行って頂き、その判定結果を集計後、この手法の有用性について検討した。

2. 検査試料・DNA抽出法

参加施設には、細胞(3×10⁵個)をFTA®カードに添付した2種類のサンプル(H1805とH1806)を配付した。DNA抽出はQCWS担当部会で推奨した標準プロトコールに従って行うことを依頼し、タイピングの手技は参加施設で使用している方法に従った。

3. 結果と考察

1) 検査方法と施設数

ろ紙に附着した微量サンプルからHLA-DNAタイピングを成功させるには検査法の選択が必要とされる。そのためにも感度の良いSSO法の適用が期待される。今回のワークショップでは表1に示したように検査結果を提出した総施設数55のうちSSO法を用いてタイピングをしたのは49施設(89%)であった。そのなかでも最も多く利用したのはRELI法(45%)である。ついで最近普及したLuminex法であった(43%)。この方法は、昨年に比べ急速に普及しているように、高価な機器を必要とするが、この方法のもつ利点から今後HLA-DNAタイピングの主流になっていくと思われる。その他の手法として

SSP法が8施設(15%)、SBT法が7施設(13%)、RFLP法が2施設(4%)であった。

2) 参加施設数と判定結果一致率

a) サンプルH1805

サンプルH1805ワークショップ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タイピングQCWSで結果を提出した施設は55施設であり、最も多くの検査結果を提出したローカスはDRB1で52施設(95%)、つづいてBローカスで52施設(78%)、Aローカスで48(87%)であった。タイピング結果の型一致率はhigh resolution levelではAローカス以外の総てのローカスで100%であった。また、low/mediumレベルではA(98%)、B(97%)、DRB1(90%)といずれのローカスも90%以

表1 検査方法と使用施設数

検査方法	施設数
SSO	49
RELI	22
Luminex	19
G&G	7
One	9
Waku	5
MPH	7
INO-LIPA	1
SSP	8
One	8
SBT	7
ATRIA	6
自家	1
RFLP	2
自家	2

表2 解析結果提出施設数と一致率(H1805)

遺伝子座	結果提出施設数		コンセンサス 遺伝子型	Low/Medium		High		総合一致率(%)	ND
	N=55	(%)		結果(%)	一致率(%)	結果(%)	一致率(%)		
HLA-A	48	87	*0201	42/48(87)	41/42(98)	6/48(13)	5/6(83)	47/48(98)	3
HLA-B	50	91	*4501	37/50(74)	36/37(97)	13/50(26)	13/13(100)	49/50(98)	3
HLA-C	25	45	*1601	10/25(40)	9/10(90)	15/25(60)	15/15(100)	24/25(96)	2
HLA-DRB1	52	95	*1301	39/52(75)	35/39(90)	13/52(25)	13/13(100)	48/52(92)	3
HLA-DRB3/4/5	23	42		18/23(78)	16/18(89)	5/23(22)	5/5(100)	21/23(91)	2
HLA-DQA1	2	4	*0103	1/2(50)	0/1(0)	1/2(50)	1/1(100)	1/2(50)	
HLA-DQB1	15	27	*0603	9/15(60)	7/9(78)	6/15(40)	6/6(100)	13/15(87)	
HLA-DPB1	2	4	*0101			2/2(100)	2/2(100)	2/2(100)	

ND: not determined

low, highは解析結果に示されたタイプに基づく

上の高い一致率を示した。

A, B, DRB1 ローカスでの誤判定は、いずれもヘテロ接合体で記載されていたものである。検査結果報告で遺伝子型を記載するのに“*”をつけてない報告が A locus で 18/48 (38%) 見られた。同様に DRB3/4/5 の判定結果に遺伝子座を示す“3*”の記載が漏れている施設があった。

b) サンプル H1806

サンプル H1806 についての結果は表 3 に示した。このサンプルは HLA 型がヘテロ接合体で表されるものであることから、H1805 サンプルよりも正解率は高かったようである。Low/medium レベルでのタイピング結果は、A, DQB1 ローカス以外は 100% の一致率を見ている。A ローカスで見られた 1 例のタイピングミスは A*0201/03/07/+, A*0203/04/17/+

と記されていた。High resolution レベルでは B ローカス以外は総て 100% の一致率を示している。2 例の誤判定は、B*1310, B*4005 とタイプした例と B*4006,-とタイプした例であった。サンプル H1805 と同様に、このサンプルでも遺伝子型を意味する“*”が記載されてない報告が多く見られた (A ローカスにおいて 15/47 (32%)。また、DRB3/4/5 の遺伝子座を示す“4*”が記載されていない報告例があった。

ろ紙に附着させた培養細胞からの HLA-DNA タイピングは今回で 4 回目の試みであった。これまでの結果報告から現在の技術は充分精度の高い判定結果をもたらすと思われる。しかし、今まで使用してきた試料はいずれも通常の血液をろ紙に添付したものであることから、実用性の面からも、今後努力して血液を用いた解析ができることを期待する。

表 3 解析結果提出施設数と一致率 (H1806)

遺伝子座	結果提出施設数		コンセンサス 遺伝子型	Low/Medium		High		総合一致率(%)	ND
	N=55	(%)		結果 (%)	一致率 (%)	結果 (%)	一致率 (%)		
HLA-A	47	85	*0201, *3001	38/47 (81)	37/38 (97)	9/47 (19)	9/9 (100)	47/48 (98)	5
HLA-B	47	85	*1302, *4006	40/47 (85)	40/40 (100)	7/47 (15)	5/7 (71)	45/47 (96)	6
HLA-C	25	40	*0602, *0801	23/25 (92)	23/23 (100)	2/25 (8)	2/2 (100)	24/25 (100)	2
HLA-DRB1	53	96	*0701, *090102	44/53 (83)	44/44 (100)	9/53 (17)	9/9 (100)	53/53 (100)	1
HLA-DRB3/4/5	23	42		21/23 (91)	21/21	2/23 (9)	2/2	23/23	2
HLA-DQA1	2	5		2/2 (50)	2/2	0/2 (0)		2/2	
HLA-DQB1	13	24	*02, *03	12/13 (92)	10/12 (83)	1/13 (8)	1/1 (100)	11/13 (85)	1
HLA-DPB1	2	4		1/2 (50)	1/1 (100)	1/1 (50)	1/1 (100)	2/2 (100)	

ND: not determined

low, highは解析結果に示されたタイプに基づく

第10回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —DNA タイピング結果表記と HLA 型表記—

田中秀則, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. はじめに

日本組織適合性学会では, DNA タイピングの結果表記法について「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)で提示しており, HLA-QC ワークショップにおいても, これらの原則に従って結果を表記することとなっている。今回の HLA-QC ワークショップ(以下, QCWS)における各施設からの結果報告を基に, 結果表記の問題点について検討を行なったので報告する。

2. 結果および考察

各参加施設から提出結果の結果表記を, ローカスごとに集計し, 表記法とは異なる結果については表中に網掛けで示した(表 1~7)。また, 結果集計のために一部の結果表記を変更した。その内容を以下に示す。

- 1) ローカス名を追加した。
- 2) アリルを意味する “*” (アステリスク) を追加した。
- 3) 結果欄がブランクを意味する空欄である場合に, “-” (ハイフン) を追加した。
- 4) 判定不能, 判定不可, “?” を undef と変更した。
- 5) DNA 型が未入力で, HLA 型に結果が入力されている場合は, DNA 型を “未入力” とし集計した。

2.1. アリル表記の問題点

① ローカス名およびアステリスク “*” の表記

表記法において, ローカス名および対立遺伝子(アリル)を意味するアステリスク “*” を入力(記載)する必要がある。しかし, これまで QCWS のデータでは, これらの表記を, 便宜的に削除していた。しかし, 今回の集計から追加することとし, より表記法に近い集計を行った。また, 今回の提出結果における HLA-A, B, DRB1 ローカスのローカス名未表記は, 約 67%, アステリスク “*” 未表記は, 約 37% であった。また, DRB1 ローカス名の表記において, “DRB” と表記した施設があった。

② 区分出来ないアリルの表記

例として, A*02, A*30, B*15, B*40, B*45 など, 2桁による結果表記が数多く見られ, 2桁レベル(粗分別, low resolution)でタイピングを実施した場合の結果表記だと思われる。しかし, 試薬の特性を知るためにも, 区分できないアリルを, 表記法の「アンビギュイティ (ambiguity) の取扱いについて」に従い, 結果を表記することが必要である。

③ アンビギュイティ (ambiguity) の表記

“/” (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が, 数多く見られた。以下に, その例を示す。

- 1) 3種類のアリルを記し, 最後に “/+” とするところを, 4種類以上のアリルが表記してある(例: A*0201/04/09/17/+, B*4501/03/05/07)。

表1 HLA-DPB1 ローカス表記の集計

Sample :H1801(N=63)					
Allele:A*02010101					
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	A*02	5	1	-	58
2	A*0201	4	2	A*0201/01/03/+	1
3	A*0201/01/03/+	1	3	A*0201/04/07/+	1
4	A*0201/01L/04/+	3	4	A*020101	1
5	A*0201/02/03/+	5	5	undef	1
6	A*0201/02/04/+	1	6	未入力	1
7	A*0201/04/07/+	6			
8	A*0201/04/09+	2			
9	A*0201/04/09/+	7			
10	A*0201/07	1			
11	A*0201/07/09/+	12			
12	A*0201/07/15/+	1			
13	A*0201/07/18/+	1			
14	A*0201/09/11/+	2			
15	A*0201/4/7/+	1			
16	A*0201/65/66/+	1			
17	A*0201/66/67/+	1			
18	A*020101	5			
19	A*02010101	2			
20	HLA-A*02	1			
21	未入力	1			

Sample :H1802 (N=63)					
Allele:A*0210		Allele:A*300101			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	A*02	4	1	A*30	4
2	A*0201/01/03/+	1	2	A*3001	22
3	A*0201/02/03/+	4	3	A*3001/02/03/+	8
4	A*0201/02/04/+	1	4	A*3001/06/14/+	1
5	A*0201/03/06/+	1	5	A*3001/08	2
6	A*0206/10	4	6	A*3001/08/14/+	2
7	A*0206/10/21	1	7	A*3001/08/14L/+	1
8	A*0206/10/21/+	18	8	A*3001/11	5
9	A*0210	26	9	A*3001/14/15	3
10	A*0210/76	1	10	A*3001/14L/15	4
11	HLA-A*02	1	11	A*3001/15	2
12	未入力	1	12	A*3001/8/13/+	1
			13	A*30010	1
			14	A*300101	4
			15	HLA-A*30	1
			16	undef	1
			17	未入力	1

Sample :H1803 (N=62)					
Allele:A*020301		Allele:A*29010101			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	A*02	3	1	-	5
2	A*0201/01/03/+	1	2	A*0201/01/03/+	1
3	A*0201/02/03/+	5	3	A*29	3
4	A*0203	44	4	A*2901	9
5	A*0203/25/38	1	5	A*2901/01L/02/+	2
6	A*020301	5	6	A*2901/01N/02/+	1
7	A*203	1	7	A*2901/02/03	2
8	HLA-A*02	1	8	A*2901/02/03/+	4
9	未入力	1	9	A*2901/02/04	1
			10	A*2901/02/04+	1
			11	A*2901/02/04/+	22
			12	A*2901/02/06	1
			13	A*2901/12	2
			14	A*2901/2	1
			15	A*290101	4
			16	A*29010101	2
			17	未入力	1

Sample :H1804 (N=60)					
Allele:A*0210		Allele:A*300101			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	A*02	3	1	A*30	3
2	A*0201/01/03/+	1	2	A*3001	22
3	A*0201/02/03/+	6	3	A*3001/02/03/+	8
4	A*0206/10	3	4	A*3001/06/14/+	1
5	A*0206/10/21	1	5	A*3001/08	1
6	A*0206/10/21/+	21	6	A*3001/08/14/+	4
7	A*0210	22	7	A*3001/08/14L/+	1
8	undef	2	8	A*3001/11	5
9	N.T.	1	9	A*3001/14/15	2
			10	A*3001/14L/15	4
			11	A*3001/15	2
			12	A*3001/8/13/+	1
			13	A*300101	4
			14	N.T.	1

Sample :H1805 (N=56)					
Allele:A*02010101					
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	A*02	4	1	-	51
2	A*0201	1	2	A*0201/04/09/17/+	1
3	A*0201/01L/04/+	3	3	A*020101	1
4	A*0201/02/03/+	1	4	A*0203/04/17/+	1
5	A*0201/03/07/+	1	5	N.T.	2
6	A*0201/04/07/+	4			
7	A*0201/04/09+	3			
8	A*0201/04/09/+	7			
9	A*0201/04/09/17/+	1			
10	A*0201/07	1			
11	A*0201/07/09/+	14			
12	A*0201/07/15/+	1			
13	A*0201/07/18/+	1			
14	A*0201/09/11/+	1			
15	A*0201/65/66/+	1			
16	A*0201/66/67/+	1			
17	A*020101	4			
18	A*02010101	1			
19	undef	4			
20	N.T.	2			

Sample :H1806 (N=56)					
Allele:A*02010101		Allele:A*300101			
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1	A*02	2	1	-	5
2	A*0201/02/03/+	1	2	A*0203/04/17/+	1
3	A*0201/03/07/+	1	3	A*30	2
4	A*0206/10	4	4	A*3001	19
5	A*0206/10/21	1	5	A*3001/02/03/+	2
6	A*0206/10/21/+	19	6	A*3001/06/14/+	1
7	A*0210	20	7	A*3001/08	1
8	N.T.	2	8	A*3001/08/14/+	3
9	undef	5	9	A*3001/08/14L/+	1
10	増幅せず	1	10	A*3001/11	5
			11	A*3001/14/15	1
			12	A*3001/14L/15	5
			13	A*3001/15	2
			14	A*3001/8/13/+	1
			15	A*300101	4
			16	N.T.	2
			17	増幅せず	1

表 2 HLA-DPB1 ローカス表記の集計

Sample :H1801 (N=64)				
Allele:B*4501				
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	B*4415/4501/+	1	-	56
2	B*45	5	B*41/45/47	1
3	B*4501	17	B*4101/03/05/+	1
4	B*4501/02/03/+	9	B*4501	1
5	B*4501/03/04	1	B*4501/03/05/+	1
6	B*4501/03/04/+	2	B*4501/04/05/+	1
7	B*4501/03/05	1	undef	2
8	B*4501/03/05+	1	未入力	1
9	B*4501/03/05/+	10		
10	B*4501/03/05/07	1		
11	B*4501/03/07	2		
12	B*4501/04/05/+	3		
13	B*4501/05/07	1		
14	B*4501/07	7		
15	B*4501/3	1		
16	HLA-B*45	1		
17	未入力	1		

Sample :H1802 (N=64)				
Allele:B*130201		Allele:B*40060101		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	-	1	B*40	3
2	B*13	5	B*4002/03/04/+	1
3	B*1301/02/03/+	5	B*4004/06/44	1
4	B*1301/02/07/+	2	B*4004/06/53	1
5	B*1301/02/07N/+	1	B*4006	37
6	B*1301/02/08	1	B*4006/44	7
7	B*1301/02/08/+	1	B*4006/53	6
8	B*1301/03/11	1	B*400601	2
9	B*1302	10	B*40060101	2
10	B*1302/03	2	HLA-B*40	1
11	B*1302/08	29	undef	1
12	B*1302/14	1	未入力	1
13	B*1302/8	1		
14	B*130201	1		
15	HLA-B*13	1		
16	undef	1		
17	未入力	1		

Sample :H1803 (N=63)				
Allele:B*070501		Allele:B*1519		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	B*07	3	B*05	1
2	B*07/15	1	B*15	3
3	B*0702/03/04/+	1	B*15/48/95	1
4	B*0702/04/07	1	B*1501/04/07/+	3
5	B*0702/05/06/+	1	B*1501/04/12/+	1
6	B*0705	6	B*1501/12/13/+	1
7	B*0705/06	44	B*1501/12/14/+	1
8	B*0705/06/40	1	B*1501/4/+	1
9	B*0705/06/4805	1	B*1506/48	1
10	B*0705/6	1	B*1512/14/19	5
11	B*070501	1	B*1512/14/19/+	2
12	HLA-B*07	1	B*1512/19	32
13	未入力	1	B*1519	9
			HLA-B*15	1
			未入力	1

Sample :H1804 (N=61)				
Allele:B*130201		Allele:B*40060101		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	B*0602	1	-	1
2	B*13	4	B*0801	1
3	B*1301/02/03/+	4	B*40	2
4	B*1301/02/07/+	2	B*4004/06/44	1
5	B*1301/02/07N/+	1	B*4004/06/53	2
6	B*1301/02/08	2	B*4006	38
7	B*1301/03/11	1	B*4006/44	6
8	B*1302	8	B*4006/53	5
9	B*1302/03	2	B*400601	2
10	B*1302/08	30	B*40060101	2
11	B*1302/14	1	N.T.	1
12	B*1302/8	1		
13	B*130201	1		
14	B*1307N	1		
15	N.T.	1		
16	undef	1		

Sample :H1805 (N=57)				
Allele:B*4501				
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	B*4415/+	1	-	51
2	B*4415/4501/+	1	B*4501/03/05/+	1
3	B*45	4	B*4501/03/05/07	1
4	B*4501	13	B*4506	1
5	B*4501/02/03/+	5	N.T.	2
6	B*4501/03/04	1	増幅せず	1
7	B*4501/03/04/+	4		
8	B*4501/03/05	1		
9	B*4501/03/05+	1		
10	B*4501/03/05/+	10		
11	B*4501/03/05/07	2		
12	B*4501/03/07	1		
13	B*4501/05/07	1		
14	B*4501/07	6		
15	N.T.	2		
16	undef	3		
17	増幅せず	1		

Sample :H1806 (N=57)				
Allele:B*130201		Allele:B*40060101		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	-	1	-	6
2	B*13	2	B*40	2
3	B*1301/02/03/+	1	B*4004/06	1
4	B*1301/02/07/+	2	B*4004/06/44	1
5	B*1301/02/07N/+	1	B*4004/06/53	1
6	B*1301/02/08	2	B*4005	1
7	B*1302	8	B*4006	31
8	B*1302/03	1	B*4006/2718	1
9	B*1302/08	29	B*4006/44	1
10	B*1310	1	B*4006/53	5
11	N.T.	2	B*400601	2
12	undef	6	B*40060101	2
13	増幅せず	1	N.T.	2
			増幅せず	1

表3 HLA-DPB1 ローカス表記の集計

Sample :H1801 (N=38)				
Allele:Cw*160101				
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	-	4	1 -	31
2	Cw*1601	14	2 ?	2
3	Cw*1601/02	2	3 Cw*1209	1
4	Cw*1601/02/08	2	4 Cw*1601	1
5	Cw*1601/06	6	5 Cw*1601/06	2
6	Cw*1601/06/07/+	2	6 未入力	1
7	Cw*1601/08	1		
8	Cw*160101	4		
9	undef	2		
10	未入力	1		

Sample :H1802 (N=38)				
Allele:Cw*0602		Allele:Cw*080101		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	Cw*06	4	1 Cw*0511/0801/+	1
2	Cw*0602	4	2 Cw*08	4
3	Cw*0602/03/07/+	3	3 Cw*0801	5
4	Cw*0602/04/06/+	4	4 Cw*0801/02/03/+	7
5	Cw*0602/07	2	5 Cw*0801/03/04/+	2
6	Cw*0602/07/09/+	1	6 Cw*0801/04/08/+	2
7	Cw*0602/07/09/+	8	7 Cw*0801/08	1
8	Cw*0602/07/12/+	2	8 Cw*0801/08/10/+	1
9	Cw*0602/09/10/+	1	9 Cw*0801/08/10/+	6
10	Cw*0602/09/11	4	10 Cw*0801/08/11	2
11	Cw*0602/09/12/+	1	11 Cw*0801/10/11	3
12	Cw*0602/10/12/+	2	12 Cw*080101	2
13	HLA-Cw*06	1	13 HLA-Cw*08	1
14	未入力	1	14 未入力	1

Sample :H1803 (N=37)				
Allele:Cw*0403		Allele:Cw*150501		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	Cw*04	1	1 Cw*0314	2
2	Cw*0401	1	2 Cw*1502/03/05/+	4
3	Cw*0401/02/03/+	2	3 Cw*1502/04/05/+	1
4	Cw*0401/03/04	1	4 Cw*1502/05/06/+	1
5	Cw*0401/03/04/+	2	5 Cw*1504/05/06/+	3
6	Cw*0403	24	6 Cw*1505	15
7	Cw*0403/06	1	7 Cw*1505/06	4
8	Cw*0403/16	3	8 Cw*1505/06/09	2
9	HLA-Cw*04	1	9 Cw*1505/09	1
	未入力	1	10 Cw*150501	1
			11 Cw*150501/02/03	1
			12 HLA-Cw*15	1
			13 未入力	1

Sample :H1804 (N=33)				
Allele:Cw*0602		Allele:Cw*080101		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	Cw*06	3	1 -	2
2	Cw*0602	3	2 Cw*0511/0801/+	1
3	Cw*0602/03/04/+	1	3 Cw*08	3
4	Cw*0602/04/06/+	2	4 Cw*0801	2
5	Cw*0602/07	1	5 Cw*0801/02/03/+	4
6	Cw*0602/07/09/+	1	6 Cw*0801/03/04/+	2
7	Cw*0602/07/09/+	8	7 Cw*0801/04/08/+	2
8	Cw*0602/07/12/+	2	8 Cw*0801/08	1
9	Cw*0602/09/10/+	2	9 Cw*0801/08/10/+	1
10	Cw*0602/09/11	4	10 Cw*0801/08/10/+	6
11	Cw*0602/09/12/+	1	11 Cw*0801/08/11	3
12	Cw*0602/10/12/+	2	12 Cw*0801/10/11	3
13	Cw*1701/02/03	1	13 Cw*080101	2
14	N.T.	1	14 N.T.	1
15	undef	1		

Sample :H1805 (N=31)				
Allele:Cw*160101				
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	-	1	1 -	25
2	Cw*1601	12	2 ?	2
3	Cw*1601/02/08	1	3 Cw*1601	1
4	Cw*1601/06	7	4 Cw*1601/06	2
5	Cw*1601/06/07/+	1	5 N.T.	2
6	Cw*1601/08	1		
7	Cw*160101	3		
8	Cw1601	1		
9	N.T.	2		
10	nodetect	1		
11	undef	2		

Sample :H1806 (N=33)				
Allele:Cw*0602		Allele:Cw*080101		
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	Cw*06	1	1 -	3
2	Cw*06/08	1	2 Cw*05/06	1
3	Cw*0602	3	3 Cw*0511/0801/+	1
4	Cw*0602/03/04/+	1	4 Cw*08	1
5	Cw*0602/07	2	5 Cw*0801	3
6	Cw*0602/07/09	1	6 Cw*0801/02/03/+	1
7	Cw*0602/07/09/+	1	7 Cw*0801/03/04/+	3
8	Cw*0602/07/09/+	9	8 Cw*0801/04/08/+	1
9	Cw*0602/07/12/+	1	9 Cw*0801/08	2
10	Cw*0602/09/10/+	2	10 Cw*0801/08/10/+	1
11	Cw*0602/09/11	3	11 Cw*0801/08/10/+	6
12	Cw*0602/09/12/+	1	12 Cw*0801/08/11	3
13	Cw*0602/10/12/+	1	13 Cw*0801/10/11	2
14	N.T.	2	14 Cw*080101	2
15	nodetect	1	15 N.T.	2
16	undef	2		

表 4 HLA-DPB1 ローカス表記の集計

Sample :H1601 (N=65)				
Allele:DRB1*130101				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 DR*1301/22/28/35/51/59/61	1	1 -	54	
2 DR*1301/27/32/+	1	2 -/DRB1*0311/24/1421	1	
3 DRB1*0311/13	1	3 -orDRB1*0311/24orDRB1*1421/34	1	
4 DRB1*13	4	4 ?/DRB1*0311/24/1421	1	
5 DRB1*1301	8	5 DRB1*0302/07/12/+	1	
6 DRB1*1301/02/03/+	8	6 DRB1*11/13	1	
7 DRB1*1301/02/06/+	1	7 DRB1*13/14	1	
8 DRB1*1301/02/10/+	1	8 DRB1*1301/02/03/+	1	
9 DRB1*1301/02/16/+	3	9 DRB1*1301/02/16/+	1	
10 DRB1*1301/02/16/67	1	10 DRB1*130101	1	
11 DRB1*1301/02/22/+	1	11 DRB1*undef	1	
12 DRB1*1301/06/08/+	1	12 undef	1	
13 DRB1*1301/06/08/+	4			
14 DRB1*1301/06/09/+	1	(以下左欄からの続き)		
15 DRB1*1301/10	1	22 DRB1*1301/35/40/+	1	
16 DRB1*1301/16/28/+	7	23 DRB1*1301/51	1	
17 DRB1*1301/2	1	24 DRB1*1301/51/61	1	
18 DRB1*1301/22/28/+	2	25 DRB1*1301/68	1	
19 DRB1*1301/27/32/+	1	26 DRB1*130101	7	
20 DRB1*1301/28/35/+	3	27 HLA-DRB1*13	1	
21 DRB1*1301/28/61	1	28 undef	1	

Sample :H1803 (N=64)				
Allele:DRB1*100101		Allele:DRB1*150201		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 -	2	1 DR*1502/08/14	1	
2 DR*1001	2	2 DR*1502/11/14	1	
3 DRB1*10	2	3 DRB1*15	3	
4 DRB1*1001	49	4 DRB1*1501/02	1	
5 DRB1*1001/2	1	5 DRB1*1501/02/03/+	11	
6 DRB1*100101	7	6 DRB1*1501/02/04/+	9	
7 HLA-DRB1*10	1	7 DRB1*1501/02/08	1	
		8 DRB1*1501/02/14	1	
		9 DRB1*1501/04/05/+	1	
		(以下右欄からの続き)		
17 DRB1*1502/08/14+	1	10 DRB1*1501/2/4/+	1	
18 DRB1*1502/08/14/+	3	11 DRB1*150101	1	
19 DRB1*1502/11/15	1	12 DRB1*1502	8	
20 DRB1*1502/14	1	13 DRB1*1502/06/11/+	1	
21 DRB1*150201	6	14 DRB1*1502/08	1	
22 HLA-DRB1*15	1	15 DRB1*1502/08/11/+	4	
23 undef	1	16 DRB1*1502/08/14	5	

Sample :H1805 (N=58)				
Allele:DRB1*130101				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 DR*1301/22/28/35/51/59/61	1	1 -	49	
2 DR*1301/27/32/+	1	2 -/DRB1*0311/24/1421	1	
3 DRB1*0311/13	1	3 -orDRB1*0311/24orDRB1*1421/34	1	
4 DRB1*0301/14/15/+	1	4 ?/DRB1*0311/24/1421	1	
5 DRB1*13	3	5 DRB1*13/14	1	
6 DRB1*1301	8	6 DRB1*1301/02/16/+	1	
7 DRB1*1301/02/03/+	2	7 DRB1*130101	1	
8 DRB1*1301/02/08/+	2	8 N.T.	2	
9 DRB1*1301/02/10/+	1	9 undef	1	
10 DRB1*1301/02/16/+	2			
11 DRB1*1301/02/22/+	1			
12 DRB1*1301/06/08/+	1	(以下左欄からの続き)		
13 DRB1*1301/06/08/+	4	19 DRB1*1301/28/61	1	
14 DRB1*1301/06/09/+	1	20 DRB1*1301/35/40/+	1	
15 DRB1*1301/10	1	21 DRB1*1301/51	1	
16 DRB1*1301/16/28/+	7	22 DRB1*130101	6	
17 DRB1*1301/22/28/+	3	23 N.T.	2	
18 DRB1*1301/28/35/+	3	24 undef	4	

Sample :H1802 (N=65)				
Allele:DRB1*070101		Allele:DRB1*090102		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 DR*0701	1	1 -	1	
2 DR*0701/03/04/+	1	2 DR*0901	1	
3 DR*0701/03/05/06/07	1	3 DR*0901/02/03/+	1	
4 DRB1*07	4	4 DRB1*09	4	
5 DRB1*0701	8	5 DRB1*09/01/04/05	1	
6 DRB1*0701/02/03/+	3	6 DRB1*0901	13	
7 DRB1*0701/03/04	1	7 DRB1*0901/02	5	
8 DRB1*0701/03/04+	1	8 DRB1*0901/02/03	9	
9 DRB1*0701/03/04/+	26	9 DRB1*0901/02/03/+	8	
10 DRB1*0701/03/05/+	10	10 DRB1*0901/02/03/¥	1	
11 DRB1*0701/05	1	11 DRB1*0901/02/04	4	
12 DRB1*0701/09	1	12 DRB1*0901/02/04/+	1	
13 DRB1*0701/09/10	1	13 DRB1*0901/03	2	
14 DRB1*0701/3/4/+	1	14 DRB1*0901/03/04	1	
15 DRB1*070101	3	15 DRB1*0901/04	2	
16 HLA-DRB1*07	1	16 DRB1*0901/04/05	4	
17 undef	1	17 DRB1*090102	6	
		18 HLA-DRB1*09	1	

Sample :H1804 (N=64)				
Allele:DRB1*070101		Allele:DRB1*090102		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 DR*0701	1	1 -	1	
2 DR*0701/03/04/+	1	2 DR*0901	1	
3 DR*0701/03/05/06/07	1	3 DR*0901/02/03/+	1	
4 DRB1*07	4	4 DRB1*09	4	
5 DRB1*0701	7	5 DRB1*09/01/04/05	1	
6 DRB1*0701/02/03/+	2	6 DRB1*0901	13	
7 DRB1*0701/03/04	2	7 DRB1*0901/02	4	
8 DRB1*0701/03/04+	1	8 DRB1*0901/02/03	8	
9 DRB1*0701/03/04/+	26	9 DRB1*0901/02/03/+	8	
10 DRB1*0701/03/05/+	10	10 DRB1*0901/02/03/¥	1	
11 DRB1*0701/09	1	11 DRB1*0901/02/04	4	
12 DRB1*0701/09/10	1	12 DRB1*0901/02/04/+	1	
13 DRB1*0701/3/4/+	1	13 DRB1*0901/03	2	
14 DRB1*070101	3	14 DRB1*0901/03/04	1	
15 N.T.	1	15 DRB1*0901/04	2	
16 undef	1	16 DRB1*0901/04/05	5	
17 未入力	1	17 DRB1*090102	5	
		18 N.T.	1	
		19 未入力	1	

Sample :H1806 (N=58)				
Allele:DRB1*0701		Allele:DRB1*1104		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 DR*0701	1	1 -	2	
2 DR*0701/03/04/+	1	2 DR*0901	1	
3 DR*0701/03/05/06/07	1	3 DR*0901/02/03/+	1	
4 DRB1*07	3	4 DRB1*09	3	
5 DRB1*0701	6	5 DRB1*09/01/04/05	1	
6 DRB1*0701/02/03/+	1	6 DRB1*0901	12	
7 DRB1*0701/03/04	2	7 DRB1*0901/02	1	
8 DRB1*0701/03/04+	1	8 DRB1*0901/02/03	8	
9 DRB1*0701/03/04/+	26	9 DRB1*0901/02/03/+	8	
10 DRB1*0701/03/05+	1	10 DRB1*0901/02/04	3	
11 DRB1*0701/03/05/+	6	11 DRB1*0901/02/04+	1	
12 DRB1*0701/05	1	12 DRB1*0901/03	2	
13 DRB1*0701/09/10	1	13 DRB1*0901/03/04	1	
14 DRB1*070101	3	14 DRB1*0901/04	1	
15 N.T.	2	15 DRB1*0901/04/05	5	
16 undef	2	16 DRB1*090102	5	
		17 DRB1*090102/04/+	1	
		18 N.T.	2	

表 5 HLA-DPB1 ローカス表記の集計

Sample :H1801 (N=35)				
Allele:DRB3*0101				
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	0101/02/03/+	1	-	32
2	52	1	DRB3*0101/02/03/+	1
3	DRB3	1	DRB3*0107	1
4	DRB3*01	2	N.T.	1
5	DRB3*01/02/03	6		
6	DRB3*0101	5		
7	DRB3*0101/04/11	1		
8	DRB3*0101/02/03	1		
9	DRB3*0101/02/03/+	5		
10	DRB3*0101/03/04+	1		
11	DRB3*0101/03/04/+	1		
12	DRB3*0101/03/05	1		
13	DRB3*0101/04/05/+	2		
14	DRB3*0101/04/11	3		
15	DRB3*0101/11	1		
16	DRB3*0101/2/4/+	1		
17	N.T.	1		
18	undef	1		

Sample :H1802 (N=35)				
Allele:DRB4*0103				
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	0101/03/05/+	1	-	27
2	53	1	0101/02/03/+	1
3	DRB4	1	DRB4*01	2
4	DRB4*01	7	DRB4*0101/03/05/+	1
5	DRB4*01/02	3	DRB4*0102/04	1
6	DRB4*0101/02/03	1	DRB4*0103	2
7	DRB4*0101/02/03/+	7	N.T.	1
8	DRB4*0101/02/05/+	1		
9	DRB4*0101/03/04/+	2		
10	DRB4*0101/03/05/+	5		
11	DRB4*0101/3/5/+	1		
12	DRB4*0103	2		
13	DRB4*0103/04/05	1		
14	N.T.	1		
15	undef	1		

Sample :H1803 (N=34)				
Allele:DRB5*0102				
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	0102/03/08/+	1	-	32
2	51	1	DRB3*0107	1
3	DRB3*0101/11	1	N.T.	1
4	DRB5*01	2		
5	DRB5*01/02	10		
6	DRB5*0101/02/03/+	4		
7	DRB5*0102	5		
8	DRB5*0102/0203/+	2		
9	DRB5*0102/03.0203	1		
10	DRB5*0102/03/08/+	2		
11	DRB5*0102/03/08N	1		
12	DRB5*0102/3/8	1		
13	DRB5*0103	1		
14	N.T.	1		
15	undef	1		

Sample :H1804 (N=33)				
Allele:DRB4*0103				
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	0101/03/05/+	1	-	24
2	53	1	0101/02/03/+	1
3	DRB4	1	DRB4*01	2
4	DRB4*01	7	DRB4*0101/03/05/+	1
5	DRB4*01/02	4	DRB4*0102/04	1
6	DRB4*0101/02/03	1	DRB4*0103	2
7	DRB4*0101/02/03/+	4	N.T.	1
8	DRB4*0101/02/05/+	1	未入力	1
9	DRB4*0101/03/04/+	2		
10	DRB4*0101/03/05/+	5		
11	DRB4*0101/3/5/+	1		
12	DRB4*0103	2		
13	DRB4*0103/04/05	1		
14	N.T.	1		
15	未入力	1		

Sample :H1805 (N=28)				
Allele:DRB3*0101				
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	0101/03/04/+	1	-	25
2	52	1	0112	1
3	DRB3*01	2	DRB3*0107	1
4	DRB3*01/02/03	3	N.T.	1
5	DRB3*0101	5		
6	DRB3*0101/04/11	1		
7	DRB3*0101/02/03/+	3		
8	DRB3*0101/03/04+	1		
9	DRB3*0101/03/04/+	1		
10	DRB3*0101/03/05	1		
11	DRB3*0101/04/05/+	2		
12	DRB3*0101/04/11	3		
13	N.T.	1		
14	undef	3		

Sample :H1806 (N=28)				
Allele:DRB4*0103				
	Local Assignment	件数	Local Assignment	件数
1	0101/03/05/+	1	-	20
2	53	1	0101/02/03/+	1
3	DRB4*01	7	DRB4*01	2
4	DRB4*01/02	4	DRB4*0101/03/05/+	1
5	DRB4*0101/02/03	1	DRB4*0102/04	1
6	DRB4*0101/02/05/+	1	DRB4*0103	2
7	DRB4*0101/03/04/+	2	N.T.	1
8	DRB4*0101/03/05/+	5		
9	DRB4*0103	2		
10	N.T.	1		
11	undef	3		

表 6 HLA-DPB1 ローカス表記の集計

Sample :H1801 (N=5)					
Allele:DQA1*0103					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*0103	3	1	-	3
2	N.T.	1	2	DQA1*0103/06	1
3	undef	1	3	N.T.	1

Sample :H1803 (N=5)					
Allele:DQA1*0101		Allele:DQA1*0105			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*0101	1	-	-	2
2	DQA1*0101/02/04/+	2		DQA1*0101/02/04/+	1
3	N.T.	1		DQA1*0105	1
4	undef	1		N.T.	1

Sample :H1805 (N=5)					
Allele:DQA1*0103					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*0103	2	-	-	2
2	N.T.	2		DQA1*0601/02	1
3	undef	1		N.T.	2

Sample :H1801(N=29)					
Allele:DQB1*0603					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQB1*06	4	1	-	23
2	DQB1*0601/02/03/+	7	2	DQB1*0601/02/03/+	1
3	DQB1*0603	9	3	DQB1*0603	1
4	DQB1*0603/07/14	1	4	DQB1*0603/26	1
5	DQB1*0603/07/14/+	1	5	DQB1*0603/26N	1
6	DQB1*0603/14	2	6	判定不可	1
7	DQB1*0603/26N	2	7	未入力	1
8	HLA-DQB1*06	1			
9	undef	1			
10	未入力	1			

Sample :H1803 (N=28)					
Allele:DQB1*050101		Allele:DQB1*050201			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQB1*05	3	1	-	11
2	DQB1*0501	14	2	DQB1*0501/02/03/+	1
3	DQB1*0501/02/03/+	7	3	DQB1*0502	13
4	DQB1*050101	1	4	DQB1*050201	2
5	HLA-DQB1*05	1	5	未入力	1
6	undef	1			
7	未入力	1			

Sample :H1805 (N=20)					
Allele:DQB1*0603					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQB1*06	1	1	-	13
2	DQB1*0601/02/03/+	1	2	DQB1*0603/07/26N	1
3	DQB1*0603	8	3	DQB1*0603/26	1
4	DQB1*0603/07	1	4	DQB1*0603/26N	1
5	DQB1*0603/07/14	2	5	N.T.	2
6	DQB1*0603/07/14/+	1	6	未入力	2
7	DQB1*0603/14	1			
8	DQB1*0603/26N	1			
9	N.T.	2			
10	未入力	2			

Sample :H1802 (N=5)					
Allele:DQA1*0201		Allele:DQA*0302			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*0201	3	1	-	1
2	N.T.	1	2	DQA1*0301/02/03	2
3	undef	1	3	DQA1*0302	1

Sample :H1804 (N=5)					
Allele:DQA1*0201		Allele:DQA*0302			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*0201	3	1	-	1
2	N.T.	1	2	DQA1*0301/02/03	2
3	undef	1	3	DQA1*0302	1
			4	N.T.	1

Sample :H1806 (N=5)					
Allele:DQA1*0201		Allele:DQA*0302			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*0201	2	1	-	1
2	N.T.	2	2	DQA1*0301/02/03	2
3	undef	1	3	N.T.	2

Sample :H1802 (N=29)					
Allele:DQB1*0202		Allele:DQB1*030302			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQB1*02	4	1	-	1
2	DQB1*0201	1	2	DQB1*03	3
3	DQB1*0201/02	2	3	DQB1*0303	7
4	DQB1*0201/02/03	5	4	DQB1*0303/06/12	4
5	DQB1*0201/02/03/+	5	5	DQB1*0303/06/12/+	4
6	DQB1*0201/02/04	3	6	DQB1*0303/10/12/+	1
7	DQB1*0201/2	1	7	DQB1*0303/12/15	5
8	DQB1*0202	4	8	DQB1*030302	2
9	DQB1*0302	1	9	HLA-DQB1*03	1
10	HLA-DQB1*02	1	10	未入力	1
11	undef	1			
12	未入力	1			

Sample :H1804 (N=26)					
Allele:DQB1*0202		Allele:DQB1*030302			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	-	1	1	-	1
2	DQB1*02	4	2	DQB1*03	3
3	DQB1*0201	1	3	DQB1*0302	1
4	DQB1*0201/02	2	4	DQB1*0303	7
5	DQB1*0201/02/03	3	5	DQB1*0303/06/12	3
6	DQB1*0201/02/03/+	5	6	DQB1*0303/06/12/+	3
7	DQB1*0201/02/04	3	7	DQB1*0303/10/12/+	1
8	DQB1*0201/2	1	8	DQB1*0303/12/15	4
9	DQB1*0202	3	9	DQB1*030302	1
10	N.T.	1	10	N.T.	1
11	undef	1	11	未入力	1
12	未入力	1			

Sample :H1806 (N=20)					
Allele:DQB1*0202		Allele:DQB1*030302			
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQB1*0201/02	3	1	-	4
2	DQB1*0201/02/03	1	2	DQB1*0303	3
3	DQB1*0201/02/03/+	4	3	DQB1*0303/06/12/+	3
4	DQB1*0201/02/04	3	4	DQB1*0303/10/12	1
5	DQB1*0202	2	5	DQB1*0303/10/12/+	1
6	DQB1*0302	1	6	DQB1*0303/12/15	4
7	N.T.	2	7	DQB1*030302	1
8	undef	3	8	N.T.	2
9	未入力	1	9	未入力	1

表7 HLA-DPB1 ローカス表記の集計

Sample :H1801				
Allele:DPB1*020102		Allele:DPB1*030101		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 DPB1*0201/0801	1	1 -		1
2 DPB1*020102	1	2 DPB1*030101		1
3 N.T.	1	3 DPB1*5701/1002/+		1
4 undef	1	4 N.T.		1

Sample :H1803				
Allele:DPB1*010101				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 DPB1*0101	1	1 -		3
2 DPB1*010101	1	2 N.T.		1
3 N.T.	1			
4 undef	1			

Sample :H1805				
Allele:DPB1*010101				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 DPB1*0101	1	1 -		3
2 DPB1*010101	1	2 N.T.		1
3 N.T.	1			
4 undef	1			

Sample :H1802				
Allele:DPB1*1701		Allele:DPB1*1901		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 DPB1*1701	2	1 -		1
2 N.T.	1	2 DPB1*0802/1901		1
3 undef	1	3 DPB1*1901		1
		4 N.T.		1

Sample :H1804				
Allele:DPB1*1701		Allele:DPB1*1901		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 DPB1*1701	2	1 -		1
2 N.T.	1	2 DPB1*0802/1901		1
3 undef	1	3 DPB1*1901		1
		4 N.T.		1

Sample :H1806				
Allele:DPB1*1701		Allele:DPB1*1901		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	件数
1 DPB1*1701	2	1 -		1
2 N.T.	1	2 DPB1*0802/1901		1
3 undef	1	3 DPB1*1901		1
		4 N.T.		1

2) 区分不可能なアリの表記で、2番目以降は2桁で表記するところを、1桁で表記している(例:A*3001/8/13/+, B*0705/6, B*1501/4/+, DRB4*0101/3/5/+).

3) 3種類のアリを表記し、最後に“/+”とするところを、2種類のアリに“/+”を付けた表記をしている(例:B*1501/4/+).

4) 3種類のアリを表記し最後に“/+”とするところを、“+”だけで表記してある(例:Cw*0801/08/10+, Cw*0602/07/09+, A*0201/04/09+).

④ N (null) および L (low) の表記

表記法の「アンビギュイティ (ambiguity) の取扱いについて」では、区分出来ないアリを、最初4桁、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”については、表記しない。(例:A*2901/01N/02/+, B*1301/02/07N/+ 等)

⑤ 5桁目以降の区分出来ないアリの表記

表記法では、「5桁以上の細分化が知られているアリで、5桁以上でアリが特定できた場合のみ、その桁数でアリを記載する」とされており、5桁目以降の区分出来ないアリがある場合(例:Cw*150501/02/03)は、4桁で表記(例:Cw*1505)することになっている。

⑥ 判定不能、判定不可、N.D., ?, nd の表記

これまでのワークショップ集会において、判定不

能および判定不可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ている。

しかし、この表記 (undef) の使用については、表記法で「判定されたアリが一つで、それ以外に明らかに異なるアリの存在が疑われるが、そのアリが特定出来ない場合に、“nd” と記載しても良い」という“nd”の表記と違いが明確でないこともあり、今後学会誌等で再度表記法を示すようにしたい。

⑦ HLA-DRB3, DRB4 および DRB5 ローカスの表記

HLA-DRB3, DRB4 および DRB5 遺伝子座における結果表記として以下の問題点があった。

1) ローカス名 (DRB3, DRB4, DRB5) だけの結果表記

2) HLA 型 (51, 52, 53) での表記

3) ローカス名を記載していない表記 (“0102/03/08/+”)

何れも、DNA タイピングでの結果表記としては適切ではない。以前より、これらのローカスに関する表記法が適切でない例が多く見られている。次回以降、正確に意味のある表記をすることが望まれる。

⑧ アリ未入力

アリ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。

QCWS のデータとしては、アレルも表記し、それに従って対応する HLA 型を表記するべきである。

⑨ アレルがひとつしか検出されない場合の表記
表記法において、アレルがひとつしか検出されなかった場合、同一のアレルを後ろのカラムに表記せず、後ろのカラムには、「-」を記載することとなっている。

2.2. HLA 型の表記の問題点

HLA 型 (HLA 抗原型) の表記について、9 施設で HLA 型が表記されていなかった。また、2 施設でアレルが表記されず、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、両方の表記をするようにしているため、DNA 型と HLA 型の関係を理解して、結果を入力する必要がある。

HLA-A ローカスの HLA 型表記では、A*0210 および A*0203 に対応する HLA 型が公認された A210 および A203 であることから、A2 と表記することは、間違いである。また、HLA 型をアレル表記が混同した例 (A*203) も見られた。

B 座の HLA 型表記では、以前の QCWS におい

ても指摘したが、B15 グループのアレルと HLA 型の関係は複雑である。今回の QCWS では、B*1512/19 または B*1519 とタイピングされている場合の HLA 型が、B76 とするところを B62 と表記している施設があった。また、B*15 と結果を表記し、HLA 型は B62 または B76 と表記されている施設もあった。HLA 型が、B62 または B76 と HLA 型が限定出来るのであれば、B*15 というアレル表記は間違っている。慎重に結果の記載する必要がある。

HLA-DRB3, DRB4, DRB5 遺伝子座の HLA 型表記で、遺伝子座名である、DRB3, DRB4, DRB5 が HLA 型として使われていた。HLA-DR51, DR52, DR53 が、これら遺伝子の対応する HLA 型 (抗原型) であることを、十分認識して頂きたい。また、アレル名に基づくのか “1” と表記されている施設もあった。

HLA-DQB1 の HLA 型表記の表記として、アレル表記との混同している例が見られた、(例: HLA-DQ06, DQB1*06 (下線部分は余分)、また、DQB1*0303/10/12/+ の HLA 型を “8/9” と表記してあったが、DQ9 で問題ないと思われる。

第 10 回 HLAQC ワークショップ(抗体部門) —企画と実施内容・総合解析—

中島文明, 赤座達也, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. はじめに

HLA 抗体検査はさまざまな方法が混在し、施設によって採用する方法も異なる。タイピング検査と違

い、その結果は免疫刺激や治療とともに簡単に変化し、時には、その抗体特異性は非常に幅広く、どこまで捉えればいいのか困惑することも多い。検査方

法の違いで結果の相違をきたすこともある。このように、HLA 抗体検査の結果は掴みどころがなく、焦点が絞られきれない。

幸いなことに、市販の高感度試薬が充実してきて、これまで不可能とされていたところまで詳細に検出できるようになった。一方、実際の生体内の反応は、市販の高感度試薬が検出する抗体特異性すべてが関係している確証は何もない。生体材料と精製抗原の違いや、さまざまな場面における生体反応に参与する抗体特異性、あるいはアイソタイプは何であるかなど、まだまだ解明すべき点はある。

今回で2回目となる抗体部門 QC では、前回と同様な目的に加え、抗体アイソタイプの解析も試みた。

2. 企画と実施内容

2.1. 目的と実施経過

この QC の最も基本的なことは「HLA 抗体検査の理解と普及」であり、さまざまな方法に対する技術向上と普及を目的としている。「検査施設間の同一検査法での比較検討」と「異なった検査法間の結果の比較」といった目的に対しては、統一形式のデータファイル収集に基づき、方法別に解析担当者を選任し解析を進めた。「Ig アイソタイプ別の抗体特異性解析」は、中央血液研究所でおこなった。実施経過は別表のとおりである。(表1)

表1 実施経過

平成18年3月17日	参加申込み締切り
平成18年4月	研究倫理審査申請
平成18年5月中旬	抗体検査サンプル配布
平成18年6月中旬	データ入力シート配布
平成18年6月30日	データ提出締切り
平成18年7月下旬	抗体QCデータ解析・発表希望者募集
平成18年8月下旬	解析結果送付
平成18年9月24日	QCワークショップ集会

2.2. サンプルの選択と配布

使用するサンプルは前回同様、倫理面の配慮から市販のヒト由来 HLA 抗血清を用い、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。LCT 法でプレスクリーニングした4本を選択し、これらを必要量購入し原液のまま各施設に1ml ずつ配布した。これらの選択基準は別表に内容を示す。(表2)

2.3. データ収集と検査方法別集計

Microsoft Excel で統一形式の検査方法別入力ファイルを配布し、必要に応じて画像データファイル、測定データファイルを収集した。参加施設は前年と比較し一割ほど減ったが、内訳はほぼ一緒であった。(表3) 方法別では、PAKPLUS と LAT が減り、FlowPRA と LABScreen が増え、パネル形態別で

表2 配布した HLA 抗体サンプルと選定理由

QC番号	在庫量 (ml)	力価 (LCT法)	特異性 (LCT法)	コメント
SH1801	60	x1	A26	x2→ A26(negative A*2603)
SH1802	60	x1-2	A25 A26 A66	
SH1803	60		(-)	FowPRA Screening HLA Class I (+)、Class II (+)
SH1804	35	x1-4	B35 B53	

- | | |
|-----------------------------|--------------|
| 1. 第9回のサンプルと異なった抗体特異性 | → SH1801/2/4 |
| 2. 類似した抗原エピトープを認識している2種類の抗体 | → SH1801/2 |
| 3. LCT法で同一抗原グループの一部を欠く抗体特異性 | → SH1801 |
| 4. LCT法で反応陰性の抗体 | → SH1803 |
| 5. B座の鋭敏な抗体特異性 | → SH1804 |

上記4本をこのQC番号でSH1801-1803は原液のまま、SH1804はPBSで2倍希釈して1ml ずつ配布

表3 参加施設と内訳(前回と今回の比較)

	9th		10th	
	n	%	n	%
血液センター	17	35.4%	16	37.2%
大学病院	12	25.0%	11	25.6%
検査・輸血部	11	22.9%	9	20.9%
検査センター	4	8.3%	3	7.0%
研究施設	2	4.2%	3	7.0%
その他	2	4.2%	1	2.3%
(Total)	48		43	
データ提出	44	91.7%	39	90.7%

は Single antigen type が増加した. LCT 法のパネル数は前回より増えている. (表4)

3. 総合解析

「検査施設間の同一検査法での比較検討」は各解析担当に譲るとして, ここでは「異なった検査法間の結果の比較」について HLA 抗体の検出と特異性解析について述べる.

3.1. HLA 抗体の検出(有無)

クラス I 抗体は 4 本ともすべて検出できた. クラ

表4 参加施設の検査方法別一覽

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							
				施設数	パネル数	総数	抗原種類数			施設数	パネル数	総数	抗原種類数			
							A	B	Cw				DR	DRs.	DQ	DP
LCT	リンパ球	Specific	目視, 数値	16	9-85	584	24	51	17	4	5-18	47	10	3	5	5
AHG-LCT		Specific		14	10-85	576	19	44	14	x						
MPHA	血小板抽出抗原	Screening	目視	M1/G7	3	-	3	6	4	x						
		Specific		M1/G6	3-8	48	8	13	7	x						
PAKPLUS	血小板糖蛋白	Screening	数値	M2/G3	-	-	-	-	-	x						
LAT	培養リンパ球精製抗原	Screening	目視, 数値	*G3	46	-	21	43	15	*G1	30	-	15	3	7	
		Specific		*G1	28	28	20	38	15	*G1	12	12	14	3	7	
FlowPRA	培養リンパ球精製抗原	Screening	パターン	M8/G24	30	-	20	40	15	M4/G20	30	-	15	3	7	
		Specific		G2	32	400	20	40	15	x						
		Single antigen		G6	32-80	400	21	43	16	G5	32	160	15	3	7	Mix
LABScreen	培養リンパ球精製抗原	Screening	数値	*M1/G5	42	-	21	43	15	*M1/G5	24	-	15	3	7	
		Specific		M2/G8	55	810	20	42	15	M2/G6	35	189	15	3	7	14
		Single antigen		M2/G7	38-91	810	26	50	15	M2/G5	25	189	15	3	7	
LIFT	リンパ球	Specific	パターン	G2	20-73	93	10	23	7	x						

M: 2次抗体IgM, G: 2次抗体IgG (太数字: データ提出施設数, x: データなし, *: クラスI/II 同時検査) パネル総数は同一キットで重複あり

表5 施設別抗体検出率(有無)

	2次抗体	検査方法	Class I				Class II			
			SH1801	SH1802	SH1803	SH1804	SH1801	SH1802	SH1803	SH1804
検査方法別	IgG	LCT	94%	100%	7%	88%	33%	67%	33%	67%
		AHG	100%	100%	57%	100%				
		MPHA	88%	100%	100%	100%				
		PAKPLUS	100%	100%	0%	100%				
		LIFT	100%	100%	100%	100%				
		LAT	100%	100%	33%	100%	100%	100%	100%	0%
		FlowPRA	100%	100%	96%	100%	100%	95%	100%	0%
	LABScreen	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	13%	
	IgM	MPHA	0%	0%	0%	0%				
		PAKPLUS	0%	0%	0%	100%				
FlowPRA		43%	0%	0%	0%	67%	33%	33%	0%	
LABScreen		100%	50%	50%	50%	0%	0%	0%	0%	
2次抗体別	IgG		98%	100%	89%	100%	100%	97%	100%	3%
	IgM		42%	8%	8%	17%	40%	20%	20%	0%
総合判定			100%	100%	82%	94%	88%	92%	96%	4%

ス II 抗体は SH1804 が陰性と考えられる。そのうち IgM は SH1802 と SH1804 は陰性である。方法別では SH1803 のクラス I は LCT 法, PAKPLUS, LAT で十分に検出できていない。

IgM 抗体については, LABScreen がクラス I で, FlowPRA がクラス II で非特異反応を拾っている可能性がある。二次抗体をメーカー指定品以外で使用する場合は, 検定とプロトコールの見直しが必要と考えられる。

3.2. HLA 抗体の特異性解析

3.2.1. SH1801

LCT 法によるプレスクリーニングでは A26 特異性のうち A*2603 のパネルと反応しないことが確認されている。今回の LCT 法の結果では A26 パネルの一部が反応陰性であることが認められるが, 抗原のアサインが A26 のままなのでその違いが判らない。一方, 市販試薬には A*2603 抗原が含まれていないので, 反応するかどうかが確認できなかった。FlowPRA や LABScreen など高感度な方法では A2, A9 関連以外の A ローカス抗原とほとんど反応し, C ローカス抗体特異性も検出している。クラス II は DR53, DQ3 などの抗体特異性が認められた。

3.2.2. SH1802

SH1801 と同じく A10 関連の特異性が認められた。こちらはプレスクリーニングで A*2603 パネルの反応が確認できている。他に, B5 関連の特異性が認められ, 高感度法では B15, B40 関連以外の多くの特異性が検出されている。クラス II は DR8, DR12 に加え DR52, DQ4 なども検出された。DR8 特異性はプレスクリーニング LCT 法の感度で DRB1*0803 と反応し, DRB1*0802 と反応しないことが確認されている。今回の LCT 法の結果では DR8 パネルの一部が反応陰性であることが認められるが, 抗原のアサインが DR8 のままなのでその違いが確認できなかった。

3.2.3. SH1803

SH1803 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。基本的に A9 抗体特異性が認められ, 高感度法で B40 関連特異性が検出された。クラス II は DR2 などの他, DQ 抗原のほとんどと DP 特異性が認められた。

3.2.4. SH1804

SH1804 は B35, B5 関連抗原に鋭敏な反応を示し, 高感度法では A10 と C ローカスの一部との反応が検出された。クラス II 抗体特異性は認められない。(表 6)

4. 二次抗体 Ig アイソタイプ別の抗体特異性解析

これまで, 抗体特異性は IgG と IgM の違いまでは調べてきたが, さらに IgG1 や IgG2 などアイソタイプレベルの差はみていない。今回のサンプルについて試験的にその違いを調査した。FlowPRA Screening test で二次抗体を IgG1~IgG4 まで用意し, それぞれの反応を比較した。これらの二次抗体は感度差が出ないように検定してから使用した。このなかで, SH1801 が各アイソタイプ別のヒストグラムに差があったので, このサンプルについて FlowPRA Single Antigen test で二次抗体に IgG1~IgG4 を使用して抗体特異性を確認した。

結果は IgG1 で検出できた A33, A68 特異性が IgG3 で検出できず, また, IgG2 で検出できた Cw2, Cw4, Cw6 特異性が IgG1 で検出できなかった。IgG4 は A11, A66 以外検出できなかった。この結果を AHG-LCT 法で比較すると, 含まれる抗原の違いを考慮しても, 検出できている抗体特異性に差はなかった。ただし, C ローカス抗体特異性は検出できていない。(表 7)

このこのように, サンプルに含まれる抗体特異性は Ig アイソタイプ別にも相当多様であることが確認できた。

5. まとめ

市販抗体検査試薬はパネル構成など内容がさらに充実してきた。もはや, 検出不可能な抗体特異性はほとんど無い。しかしながら, 多くの検出方法が混在し, 施設によって採用する方法が異なれば, 感度面

表 6 検査方法別の HLA 抗体特異性比較

SH1801																						
LCT	A26	A66	A25																			
AHG-LCT	A26	A66	A25	A34	A11	A33	A68	A1														
MPHA	A26											A11	A33									
LIFT	A26											A11	A33	A1								
LAT (G)			A25	A34											B59	B62	B18	Cw16				
FlowPRA (G)	A26	A66	A25	A34	A43	A11	A33	A68	A69	A1	A36	A80	A29	CW5	Cw4	Cw6	Cw18	Cw2				
LABScreen (G)	A26	A66	A25	A34	A43	A11	A33	A68	A69	A1	A36	A80	A29	CW5								
SH1802																						
LCT	A26	A66	A25											A11								
AHG-LCT	A26	A66	A25											A11	A24	A1	A31	A33	B51	B52	B59	
MPHA	A26											A11							-	A31	A33	B52
LIFT	A26											A11	A24	A1	A33	B51	B52	B59				
LAT (G)	A66		A25															B58	B18	B59		
FlowPRA (G)	A26	A66	A25	A34	A43	A11	A68	A23	A24	A32	A36	A80	A1					Bローカス多数				
LABScreen (G)	A26	A66	A25	A34											A11	A68	A23	A24	A32	A36	A80	Bローカス多数
SH1803																						
LCT	A24																					
AHG-LCT	A24																					
MPHA	A24																					
LIFT	A24																					
LAT (G)	B7						B48															
FlowPRA (G)	A24	A23	B7	B27	B60	B61	B48	B81	B13	Cw2								Cw17				
LABScreen (G)	A24	A23	B7	B27	B60	B61	B48	B81	B13	B47	Cw2						Cw17					
SH1804																						
LCT	B35		B51																			
AHG-LCT	B35	B51	B52	A26																		
MPHA	B35		B52																			
LIFT	B35	B51	B52											B37	B58							
LAT (G)	B35	B51	B18					A26	A25	B58												
FlowPRA (G)	B35	B51	B52	B53	B18	B78	A26	A25	A66	B37	B58	B56	Cw5	Cw6								
LABScreen (G)	B35	B51	B52	B53	B18	B78	A26	A25	A66	B37	B58	B49	Cw5	Cw6								

(G) 2次抗体IgG 強陽性反応

表 7 二次抗体 Ig アイソタイプによる反応性の違い (SH1801)

Ig isotype	A Locus Specificity													C Locus Specificity				
IgG1	A26	A25	A34	A43	A66	A11	A36	A80	A1	A68	A69	A33	A29	Cw5	Cw8			
IgG2	A26	A25	A34	A43	A66	A11	A36	A80	A68					Cw5	Cw6	Cw2	Cw4	
IgG3	A26	A25	A34	A43	A66	A11	A36	A80										
IgG4											A66	A11						
AHG-LCT	A26	A25	A34	-	A66	A11	-	-	A1	A68	-	A33	-					
LCT	A26	A25	-	A66														

- 抗原が含まれていない
 強陽性反応

の影響も含めて全体的な精度管理は必要不可欠といえる。同じサンプルでありながら施設によって結果が異なるという事態は避けたい。

Ig アイソタイプ別の抗体特異性解析は本来の QC の目的から外れるが、使用したサンプルの精査と今

後の指標を探るという理由で行ってみた。精製抗原が捕らえる抗体と生体内で反応する抗体がまったく同一であるとはどうしても思えない。QC とは別の場で、このような結果と臨床成績のデータをリンクして調査していくことも重要と考える。

第10回 HLAQC ワークショップ(抗体部門) —LCT・AHG-LCT 法—

田中秀則, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. 概要

第10回 HLA-QC ワークショップ抗体部門(以下, QCWS)において, LCT および AHG-LCT 法での参加施設数は, クラス I が 16 施設, クラス II が 4 施設であった。提出された全パネル細胞(以下, パネル)数は, クラス I で 584 パネル, クラス II で 47 パネルであった。

各施設から提出された判定結果の概要を以下に示す。

LCT 法において, H1802 は全施設で陽性と判定されが, H1801 および H1804 は, 一部の施設で陰性と判定された。また, H1803 については, 陽性と判定されたのは 1 施設だけであった。また, AHG-LCT 法では, H1803 以外の 3 検体は, 全施設で陽性と判定されたが, H1803 については, 8 施設(57%)で陽性, 4 施設(29%)で陰性, 2 施設(14%)で保留と判定された。

2. セログラフ解析

提出されたデータを基に, 各検体の反応性についてセログラフを用いて解析を行った。

H1801 は, LCT 法で A26 抗原に対する反応が認められたが, AHG-LCT 法では, A26 以外に A11.1, A11 および A33 抗原に対する反応が見られた。AHG-LCT 法の全提出データ(N=577)における, A33 パネルに対する陽性率は約 50% であり, 施設別

検体	LCT 法 (16 施設)	AHG-LCT 法 (14 施設)	特異性
H1801	陽性: 15 陰性: 1	陽性: 14 陰性: 0	A1, A11, A25, A26, A33, A66 (6 種類)
H1802	陽性: 16 陰性: 0	陽性: 14 陰性: 0	A11, A24, A25, A26, A66, B35, B51, B52 (8 種類)
H1803	陽性: 1 陰性: 13 保留: 2	陽性: 8 陰性: 4 保留: 2	A24 (1 種類)
H1804	陽性: 14 陰性: 2	陽性: 14 陰性: 0	B35, B51 (2 種類)

に A33 パネルに対する反応の強さを比較したところ, 施設間差が認められた。そのため, A33 パネルに対して反応が認められない施設のデータを除外した 103 パネルのデータで, 再度解析を行ったところ,

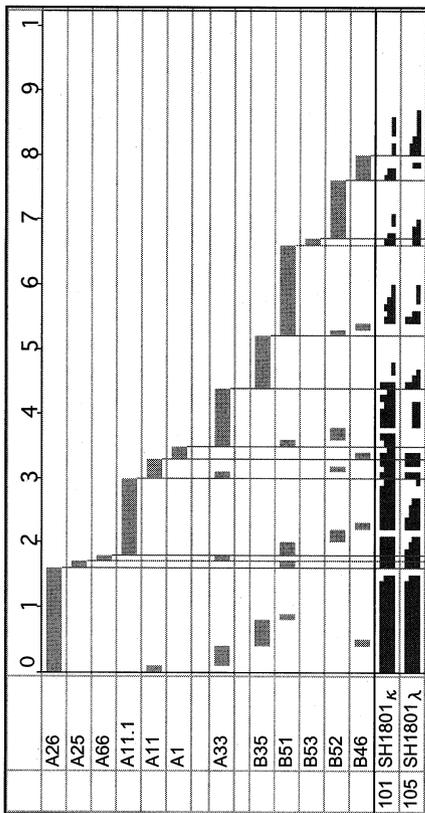


図1 H1801のAHG-LCT法におけるセログラフ(N=103)

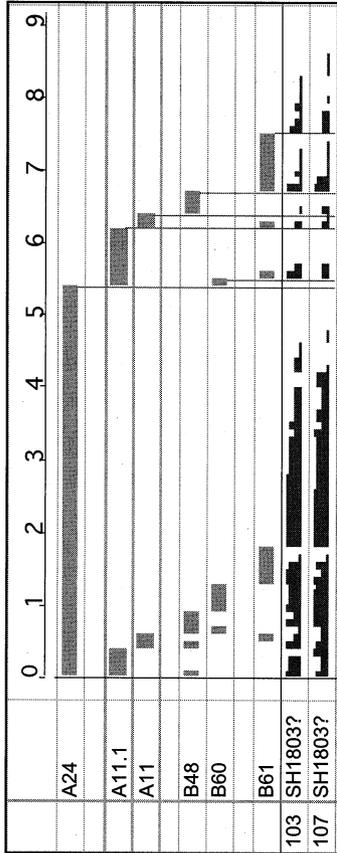


図2 H1802のAHG-LCT法におけるセログラフ(N=103)

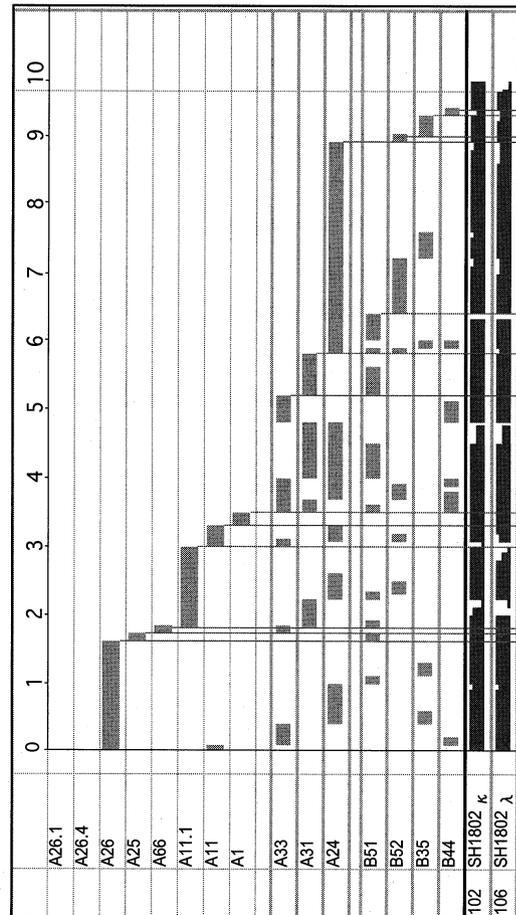


図3 H1803のAHG-LCT法におけるセログラフ(N=103)



図4 H1804のAHG-LCT法におけるセログラフ(N=103)

AHG-LCT 法 (κ 鎖)において、ほとんどの A33, A11.1, A11, A1 パネルとの反応が確認された(図 1 参照)。

H1802 は、LCT 法では A26, A25, A66 に強い反応が、A11.1, B51 および B52 弱い反応が見られた。AHG-LCT 法では、更に A33, A31, A1, A24, B35, B44 パネルに対する弱い反応が見られた。H1801 で選択したパネルデータ (N=103) を用いた解析では、LCT および AHG-LCT 法で弱い反応と思われたパネルに対して、ほぼ陽性反応を示していることが確認された(図 2 参照)。

H1803 は、LCT 法で陽性反応を示すパネルは見られなかった。AHG-LCT 法では、A24 パネルの約 25% に反応が見られたが、選択した 103 パネルにおいては、86% の A24 パネルに反応が認められた。

H1804 は、LCT 法で B35 および B51 の一部のパネルに反応が見られた。AHG-LCT 法では、B35,

B51 以外に B52, B53, B17 および B37 等のパネルに対する反応が見られた。選択したパネル (N=244) データでは、B52 に対する反応性が、AHG λ 鎖を用いた検査でより明確になった(図 4 参照)。

クラス II 抗体については、血小板での未吸収の検体で検査を行っているデータもあったことから、特異性に関する解析は困難であった(概要は配布データ参照)。

3. まとめ

AHG-LCT 法では、抗体の特異性に該当するパネルとの反応の強さが、施設間で異なっており、抗体検査に使用するパネル細胞(交差抗原の組合せまたはホモタイプ)の選択、AHG 希釈倍数や洗浄の回数等を検討することで、より有効な AHG-LCT 法での抗体検出が可能と推測される。

第 10 回 HLAQC ワークショップ(抗体部門) —検査方法別解析 (MPHA, PAKPLUS)—

中村淳子(神奈川県赤十字血液センター検査一課),
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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

MPHA

オリンパス社の MPHA 法 (Mixed Passive Hemagglutination test) キット, “anti-PLT・オリビオ・MPHAI” (ヒト血小板抽出抗原固相の 1 ウェルで判定)のデータが 7 施設より提出され, 1 施設で IgM のデータが提出された。SH1801~1804 の 4 検体とも IgG は概ね陽性となったが, ロット, 施設間差がみ

られた。(表 1) 固相されている抗原の HLA タイプが不明であり, 1 ウェルの反応で判定するので, 抗 HLA, HPA 抗体の有無を判定するには, 他法との併用が望ましい。IgM はすべて反応スコア 2 (±) 以下であった。また, MPHA 反応スコア記入シートに処理時間, 感作時間の記入欄があり, 既成キットであるが, 各施設で記入された時間に差が大きく, クロ

ロキンを処理時間、血清反応時間、感作セル分注後の時間がこの2欄に混在している可能性がある。

同じくオリンパス社のMPHAキットでHLA、HPAタイプ既知の8ウェルを用いた“anti-HPA・MPHA・パネル”でのデータが同ロットで5施設から提出され、自家製パネルを用いたデータが1施設より提出された。anti-HPA・MPHA・パネルでは、各検体とも、陽性パネルがあり、IgG抗体陽性と判定された。(表2)しかし、5施設ともに強陽性、または陰性のパネルはあるが、施設間で判定が異なるパネル(ある施設では反応スコア1が別の施設では6,2が8等)が多数みられた。非特異反応か、弱い反応を捕らえているのかは不明だが、MPHAは手作業での洗浄操作等、作業に多少熟練が必要であり、肉眼判定なので、このようなばらつきがみられるのではないだろうか。HLA抗体の特異性は、自家製パネルでのデータを加えても16パネルなので、解析が

難しく、各施設とも特異性判定スコアは4以下であった。他の方法で決定された特異性を基に、どこまでHLA抗体の特異性を捕らえているかみたとところ、SH1801はA26に対して陽性、A11, A33が弱陽性か、SH1802はA11, A26陽性、A24, A31, B35, B58が陽性が判定不能、SH1803はA24弱陽性か、SH1804はB35陽性と推察した。クロロキンを処理したウェルでは概ね未処理ウェル強陽性のパネルに反応がみられ、HPAに特異的な抗体は判別されなかった。1施設のIgMの反応は陰性であった。(表3)

PAKPLUS

血小板グリコプロテイン、HLAクラスI抗原を固相したウェルを用いたELISA法であるGTI社のキット“PAKPLUS”のデータはIgGでは3施設、そのうち2施設でIgMのデータも提出された。IgGは2種類のロットのデータにも関わらず、3施設の

表1 anti-PLT・オリビオ・MPHAIII反応スコア

Lab.	Lot	処		未		処		未		処理時間	感作時間	備考
		1801	1802	1803	1804							
18S007	51212	1	1	1	2	1	1	1	2	2h	2h	Lot.51212は抗HLA抗体との反応が悪い。
18S012-IgG	51212	1	2	1	8	1	6	1	8	1h	4h	
18S019-IgG	60209	0	2	0	8	0	8	0	1	2h	over night	
18S020	60209	1	6	1	8	1	6	1	2	2h	4h	
18S032	51212	1	1	1	8	1	6	1	8			
18S035-IgG	60209	1	6	1	8	1	8	1	8	4h	15h	
18S038	60420	1	6	1	8	1	2	1	6			
18S012-IgM	51212	2	2	1	1	1	1	2	2	1h	4h	

表2 anti-HPA・MPHA・パネル (Lot.60322) IgG反応スコア平均値・自家製パネルIgG反応スコア (18S032)

No.	HLA						処				未				HPA												
	A(1)	A(2)	B(1)	B(2)	Cw(1)	Cw(2)	1801	1802	1803	1804	Nak	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b				
1	24	31	60	-	4	10	1	1	2.3	8	1	6	1	1	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
2	24	26	7	71	7	8	1	6.8	2.3	8	1	4	1	2	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
3	1	26	37	44	6	-	1.3	8	1.5	8	1	1	1	2.6	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
4	2	24	44	52	1	-	1	1	2.8	8	1	6	1.3	3.8	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
5	31	33	58	62	4	10	1	5.2	4.5	8	1	1	2.3	2	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
6	26	-	39	54	1	7	1.3	8	4.5	8	1	1	1.3	2.2	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
7	11	31	35	60	3	-	1	4	2.5	7.2	1	2	5.8	8	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
8	2	-	39	-	7	-	1	1	2.8	2	1	2	1.3	1	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
1	24	33	61	44	NT	NT	1	1	1	1	1	1	1	1		+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
2	24	-	52	35	NT	NT	1	1	2	6	1	1	1	6		+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
3	24	11	7	39	NT	NT	1	1	1	8	1	1	6	6		+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
4	24	-	52	61	NT	NT	1	1	1	1	1	1	1	1		+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
5	31	11	52	60	NT	NT	1	1	1	6	1	1	6	6		+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
6	24	33	7	44	NT	NT	1	1	1	1	1	1	1	6		+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
7	24	-	54	48	NT	NT	1	1	1	1	1	1	1	6		+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
8	24	-	62	60	NT	NT	1	1	1	1	1	1	1	6		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

表3 anti-HPA・MPHA・パネル (Lot.60322) IgM 反応スコア (18S026)

No.	HLA						処 未				HPA													
	A(1)	A(2)	B(1)	B(2)	Cw(1)	Cw(2)	1801	1802	1803	1804	Nak	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	
1	24	31	60	-	4	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	24	26	7	71	7	8	1	1	1	1	1	1	1	1	2	-	+	-	-	+	-	+	+	-
3	1	26	37	44	6	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	+	-	+	-	+	-	+	+
4	2	24	44	52	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	+	-	+	-	+	+	+	-
5	31	33	58	62	4	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	+	-	+	-	+	+	-	-
6	26	-	39	54	1	7	1	2	1	1	1	1	1	1	1	+	+	-	+	-	+	-	+	+
7	11	31	35	60	3	-	1	1	1	1	1	1	1	2	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
8	2	-	39	-	7	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	+	-	+	-	-	+	+	-

表4 PAKPLUS IgG 反応スコア

	IgG		GPIIb/IIIa		GPIa/IIa		GPIb/IX	GPIV	HLA Class I	結果
	Lab.	LotNo.	HPA-1a/1a HPA-3a/3a HPA-4a/	HPA-1b/1b HPA-3b/3b HPA-4a/	HPA-5b	HPA-5a				
1801	18S012	121405-PP	1	1	1	1	1	1	8	HLA Class I (+)
	18S017	121405-PP	0	0	0	0	0	0	6	HLA Class I抗体 陽性
	18S019	021606-PP	1	1	1	1	1	1	8	HLA Class I (+)
1802	18S012	121405-PP	1	1	1	1	1	1	8	HLA Class I (+)
	18S017	121405-PP	0	0	0	0	0	0	8	HLA Class I抗体 陽性
	18S019	021606-PP	1	1	1	1	1	1	8	HLA Class I (+)
1803	18S012	121405-PP	1	1	1	1	1	1	1	(-)
	18S017	121405-PP	0	0	0	0	0	0	1	HLA Class I抗体 陰性
	18S019	021606-PP	1	1	1	1	1	1	1	
1804	18S012	121405-PP	1	1	1	1	1	1	8	HLA Class I (+)
	18S017	121405-PP	0	0	0	0	0	0	8	HLA Class I抗体 陽性
	18S019	021606-PP	1	1	1	1	1	1	8	HLA Class I (+)

表5 PAKPLUS IgM 反応スコア

	IgM		GPIIb/IIIa		GPIa/IIa		GPIb/IX	GPIV	HLA Class I	結果
	Lab.	LotNo.	HPA-1a/1a HPA-3a/3a HPA-4a/	HPA-1b/1b HPA-3b/3b HPA-4a/	HPA-5b	HPA-5a				
1801	18S012	121405-PP	1	1	1	1	1	1	1	(-)
	18S017	121405-PP	1	1	1	1	1	1	1	HLA Class I抗体 陰性
1802	18S012	121405-PP	1	1	1	1	1	1	1	(-)
	18S017	121405-PP	1	1	1	1	1	1	1	HLA Class I抗体 陰性
1803	18S012	121405-PP	1	1	8	8	1	1	1	(-)
	18S017	121405-PP	1	1	8	8	1	1	1	HLA Class I抗体 陰性 GPIa/IIaに対する反応あり 確認要
1804	18S012	121405-PP	6	1	1	1	6	6	8	HLA Class I (+) +?
	18S017	121405-PP	1	1	1	1	1	6	8	HLA Class I抗体 陽性 GPIVに対する反応あり 確認要

OD 値が近似値であり、HLA クラス I のウェルでは SH1801, 1802, 1804 が陽性と判定された。(表4) しか、IgM では、同ロットの2施設間で OD 値の一致は見られず、SH1803, 1804 のグリコプロテインや HLA クラス I 抗原のウェルで陽性反応が

見られた。(表5) 今回のデータでは PAKPLUS の IgG は安定した値が得られたが、IgM に関しては、SH1803, 1804 がグリコプロテインに対する抗体を含むか否かは不明ではあるが、他の検査法と併用して確認することが必要と思われる。

第10回 HLAQC ワークショップ(抗体部門) —検査方法別解析 (FlowPRA 法)—

橋本志歩(日本赤十字社中央血液研究所), 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. はじめに

今回, FlowPRA 実施施設は 24 施設であり, その内 2 施設が Specific を, 7 施設が Single Antigen を共に行った. FlowPRA はパネル形態別に Screening, Specific, Single Antigen の 3 種類があり, 判定方法は Screening と Specific / Single Antigen で大きく異なる. そこで, Screening は陽性方向にシフトしたビーズの割合(以下陽性率)に関して施設毎の違いを中心に, また, Specific / Single Antigen は各施設におけるゲートの設定方法を中心に解析を行った.

2. Screening test (表1)

抗体の有無の判定はほぼ一致していたが, 判定の基準である陽性率は各施設間において大きな差が見られた. 差を生み出す要因として, ① カットオフ, ② 測定機器の設定, ③ 測定機種, が考えられる.

① カットオフをどの位置に持っていくかには, 二通りの方法がある. 一つは測定時使用した陰性血清のヒストグラムを基に設定する方法と, 一つはサンプル毎にヒストグラムの形から決めていく方法である. 今回の結果では後者に比べて前者の方が陽性率を低く示す傾向にあった.

また, 陰性血清のヒストグラムを基にカットオフを設定する場合は, 陰性血清のバックグラウンドの影響を受ける. 今回の参加施設の内, 3 施設が自家製の陰性血清を使用し, 残る 21 施設が市販のものを

使用していた. 自家製の陰性血清を使用した場合, 市販の製品を使用した場合と比べて, 陽性率は低い値を示していた. 自家製の陰性血清の選択には, 血清自身のバックグラウンドを考慮に入れる必要がある.

② 測定機器の設定を行う場合, 陰性血清と陽性血清を使用する. 自家製の陰性血清を使用する際, バックグラウンドが高い陰性血清を用いた場合には, サンプルによってはヒストグラムの全貌が現れてこない場合がある. SH1803 血清のクラス I (IgG) において陰性と判定している回答は, このことが関係しており, ヒストグラムの全貌が見えておらず, 正確に測定されていなかったと思われる.

③ 測定機種は二つに大別され, 14 施設がベクソンデッキンソンを, 10 施設がベックマンコールターを使用していた. 今回の結果から, 測定機器の違いは陽性率に影響を及ぼしていなかった.

3. Specific / Single Antigen

この二法の測定プログラム・判定方法は同様である為, 参加施設の多かった Single Antigen のデータを使用して解析を行った.

判定方法は, サイトグラムと結果から, 陰性血清と反応させたビーズの位置を基に 1~9 のビーズを個々に比較する方法と, まとめてリージョンを設定し判定する方法の二通りがあった. (表2) それぞれの判定方法で判定結果はほぼ一致しており, ビーズ

表1 施設別陽性率

施設No.	自家製 陰性血清	測定機器	Class I				Class II			
			SH1801	SH1802	SH1803	SH1804	SH1801	SH1802	SH1803	SH1804
18S002	○	◇	53.8	72.5	5.5	18	13.1	54.8	70.4	0.2
18S003		☆	67.6	92.8	51.6	26.6	53.2	78.2	94.2	1.2
18S004	○	◇	60.6	83.3	37	38.6	26.58	37.43	76.57	0.44
18S007		◇	74.2	96.1	50.1	49.7	60.08	92.15	98.65	33.92
18S008		☆	53.6	82.8	35.8	32.6	50.3	76.25	96.14	1.64
18S012		☆	66.6	92.2	45.9	51.9	55.8	70.3	81.7	0.5
18S013		☆	68.1	87	57.7	33.4	41.1	51	95.7	0.82
18S015		☆	36.2	80.8	26.2	27.3				
18S016		◇	61	78	26	41	33	28	87	0.2
18S019		◇	60.1	94.9	42.2	39.6	50.85	72.97	94.55	0.37
18S020		◇	61.9	95.8	41.1	44.4	46.1	40	87.9	0.7
18S021	○	☆	38.3	89	13.6	21.2	15.8	49.9	71.7	0.81
18S022		◇	69	92.8	44.3	36.8	45.66	52.77	60.73	3.56
18S024		◇	60.2	89.5	30.7	35.9	21.17	52.16	85.61	0.39
18S026		◇	63.1	87.6	38.4	43.1				
18S028		◇	75.4	96.3	39.7	45.9	52.1	72	94.2	0.8
18S030		◇	57	92.2	30	33.2				
18S031		☆	65.5	92.6	27.6	43.4	15.6	62.8	29.4	0.5
18S033		☆	73	95	51	41	61	91	99	2
18S038		☆	64	87.2	30	39.8				
18S039		☆	59	93.4	28.3	36.3	44.2	76.1	92.7	1.6
18S042		◇	71.2	95.8	49.5	32.5	38.63	62.68	90.22	0.34
18S044		☆	60	90.8	20.3	28.6	50.7	69.6	93.2	1.3

☆ ベックマンコールター
◇ ベクトンディキンソン
----- <平均+SD
----- >平均+SD

表2 各施設のリージョン設定方法—Single Antigen—

判定方法			ピース毎のN.C.との比較				リージョンとの比較	
グループ	パネル	スコア	18S003	スコア	18S019	スコア	18S022	
3	1 B*5101	1		1		1		
	2 B*1301	1		1		1		
	3 B*1801	4		4		1		
	4 B*3501	4		2		1		
	5 B*1501	1		2		1		
	6 B*4501	8		4		1		
	7 B*4001	4		2		1		
	8 Control	1		1		1		
	9 B*4402	1		1		1		

● リージョンの掛け方は同じでも判定が食い違っている

を個々に比較判定している方がより多く抗体の特異性を挙げていた。(表3) また, LCT・AHG-LCT法

で検出出来ている抗体特異性を, 後者の判定方法では検出できていない例があった。

表 3 FlowPRA Single Antigen の抗体特異性

SH1801	A1 A10 A11 A33 A36 A43 A68 A80 A3 A29 A69 B16 B18 B35 B45 B47 B48 B52 B54 B60 B63 B76 Cw6 Cw8 Cw2 Cw4 Cw5 Cw12
SH1802	A9 A10 A11 A32 A36 A43 A68 A80 A1 A33 A69 B5 B7 B13 B17 B18 B22 B27 B35 B37 B38 B42 B44 B47 B49 B53 B59 B63 B67 B77 B78 B82 B39 B71 B73 B81 Cw4 Cw5 Cw6
SH1803	A9 A2 A25 A32 A33 A68 A80 B7 B27 B60 B13 B18 B45 B47 B48 B61 B81 Cw2 Cw5 Cw17
SH1804	A25 A26 A66 A68 B5 B18 B35 B37 B53 B54 B58 B78 B21 B54 B56 B63 B65 B71 Cw5 Cw6

太 字 : ピーズ個々の移動をN.C.の位置と比較している施設のみ陽性としている抗体特異性
二重下線 : LCT・AHG-LCTで陽性判定

4. まとめ

判定に一番作用しているのは、ヒストグラムおよびサイトグラムの読み方の違いであることが分かった。カットオフの位置をどこに設定するか、裏付け

を見つけ各施設で共通の基準を決めなければならない。今回、判定の相違に関して、測定機器の機種の違いは否定された。測定機器の設定に関しては各施設において各々熟知する必要がある。

第 10 回 HLAQC ワークショップ(抗体部門) —方法論別検討 (LABscreen 法)—

丸屋悦子, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. はじめに

蛍光ビーズ法 (Luminex 法) は一度に 100 種類を分別可能なビーズアレイを用い、HLA 抗原をコートしたビーズを用いた蛍光抗体法による HLA 抗体の検索や同定システムである。

迅速・簡便であるが、コストパフォーマンスについてはまだ問題が残る。HLA 抗体ワークショップの提出血清 4 種 (1801, 1802, 1803, 1804) について、10 の参加施設が Luminex 法による抗体検査・解析をおこなった。抗体解析用キットには LABscreen

mix (抗体検索用), LABscreen PRA (抗体検索と中程度の同定), LABscreen Single (抗体同定)があり, 各施設の使用キットとロットおよび使用2次抗体の種類を以下に示す。

Kit	Class	Lot	2次Ab	Lab.	Lab.	Lab.	Lab.
Mix	I & II	#10	IgG	18S011	18S012	18S03	
Mix	I & II	#11	IgG	18S033			
PRA	I	#9	IgG	18S005	18S012	18S02	18S04
PRA	I	#10	IgG	18S014	18S033	18S03	
PRA	II	#9	IgG	18S005	18S012	18S03	18S04
PRA	II	#10	IgG	18S014			
PRA	I	#9	IgG&M	18S008			
PRA	II	#9	IgG&M	18S008			
Single	I	#4	IgG	18S012			
Single	I	#5	IgG	18S005	18S011	18S04	
Single	I	#6	IgG	18S033	18S038		
Single	II	#2	IgG	18S005	18S011	18S01	
Single	II	#3	IgG	18S033	18S042		
Single	I	#6	IgG&M	18S008			
Single	I	#3	IgG	18S012			
Single	I	#5	IgG	18S005	18S011	18S04	
Single	I	#6	IgG	18S033			
Single	I	#6	IgG&M	18S008			
Single	I	#5	IgG	18S012			
Single	I	#6	IgG	18S005	18S033		
Mix	I & II	#10	IgM	18S012			
PRA	I	#9	IgM	18S012			
Single	I	#4	IgM	18S012			
Single	II	#2	IgM	18S012			
Single	I	#3	IgM	18S012			
Single	I	#5	IgM	18S012			

2. 抗体スクリーニングについての評価

• IgG 抗体について(参加全施設が回答)

HLA-class I 抗体: 全血清について, 抗体有無の評価は全施設の結果は一致していた(一致率 = 100%)。

HLA-class II 抗体: 1804 以外の血清について, 一致率 100% (1804 は 1 施設判定保留)であった。

• IgM 抗体について(2 施設が回答)

HLA-class I 抗体: 一致率が 50% の血清が 3 種と大半をしめ使用 2 次抗体にも問題がありそうである。

提出血清番号

抗体の種類	2次抗体	1801	1802	1803	1804
HLA-class I	IgG	8	8	8	8
HLA-class II	IgG	8	8	8	1
HLA-class I	IgM	8	8/1	8/4	8/1
HLA-class II	IgM	1/4	4/1	4	1

8 = 陽性(有) 4 = 保留 1 = 陰性(無)

HLA-class II 抗体: 一致率が 50% の血清が 2 種 (50%)。

3. 抗体同定結果

抗体の同定をおこなった 9 施設について, 全血清についての比較データは紙面上の余裕がないため, 1 種の血清を代表として報告する。表 1 に HLA-class I 抗体特異性同定結果の比較と同一 LOT での蛍光値の比較を示す。表 2 に HLA-class II 抗体について示す。HLA-class I と class II 抗体ともに, 同一の抗原特異性を陽性と判定する施設と陰性と判定する施設があり, その判定の基準が蛍光値を基準にしたものではない施設が多く見られた。他の血清についても同様の現象が見られた(個々のデータはワークシヨップデータを参照)。

4. まとめ

今回の結果から HLA 抗体検索・同定キットである LABscreen kit について次のことが分かった。

- Cut off 値の統一が必要
- Kit 試薬の Lot による感度差がある
- Kit 化されていない 2 次抗体の感度差がある

次回 QCW の課題は Luminex 法による HLA 抗体検索・同定について, LABscreen kit の判定基準設定法の検討と考えられる。

第10回 HLAQC ワークショップ(抗体部門)

—方法論別検討 (LAT・LIFT 法)—

中島文明, 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#

#: 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 部会構成員: 木村彰方^{1,2)}, 赤座達也¹⁰⁾, 太田正穂³⁾, 柏瀬貢一⁴⁾, 小林賢⁵⁾, 酒巻建夫⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 田中秀則⁴⁾, 中島文明⁸⁾, 成瀬妙子⁹⁾, 丸屋悦子¹⁰⁾, 安波道郎^{2,11)} (所属: 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, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. LAT

LAT はプレートを用い精製抗原を固相した ELISA 法であり, FlowPRA や LABScreen と同じく, スクリーニング用, 抗体特異性同定用, Single antigen type (クラス I のみ) が揃っている. 市販精製抗原試薬の中で, 最も簡便に操作できる方法といえる.

今回, LAT は 4 施設が使用しており, 3 施設がスクリーニング用(2 施設はクラス I のみ), 1 施設(クラス I と II) が抗体特異性同定用を使用した.

サンプル SH1803 のクラス I 抗体において, スクリーニング用 3 施設のうち 2 施設は測定スコア「2」で判定は「抗体無」, 1 施設は測定スコア「6」であるが判定結果が未記入であった. 同じく同定用を使用した施設は「抗体有」と判定した. サンプル

SH1804 のクラス II 抗体は, 実施した 2 施設とも「抗体無」と判定した. その他のサンプルについてはすべて検出できていた. 二次抗体はすべて IgG で, IgM の検討はなかった. (表 1)

特異性解析は 1 施設のみで, パネル数と内容が十分でないため, 確実な結果に至っていない. この施設はサンプルの希釈倍率 3 倍のところ 4 倍で操作していた. (表 2)

SH1803 の結果から, 検出感度は FlowPRA や LABScreen より低いといえる. 同じ精製抗原試薬でありながらこのような差が生じる原因は, テラサキ・プレート上の操作のため, 洗浄操作が確実に行えない点が考えられる. 温度管理も問題がありそうである.

表 1 LAT の抗体検出率

No.	Lab ID	分類	Cat code	Lot No.	2次抗体	希釈率	測定法	HLAクラス I 抗体				HLAクラス II 抗体			
								SH1801	SH1802	SH1803	SH1804	SH1801	SH1802	SH1803	SH1804
1	18S002	LAT-Mix	LATM120	#009	FITCIgG	2倍	目視	有	有	無	有				
2	18S037		LAT M10X5	009	IgG	1:2	機器	8	8	1	8	8	8	8	1
3	18S040		LATM120	9		2倍	目視	未記入							
4	18S016	LAT (Specifc)	1240	2	抗IgG	4	目視	有	有	有	有	有	有	有	無
抗体有								3	3	1	3	2	2	2	0
抗体無								0	0	2	0	0	0	0	2
陽性率								##	##	##	##	##	##	##	0%

2. LIFT

LIFTはフローサイトメーターを用い、モノクローナル抗体で目的細胞に絞り込み、リンパ球抗原とサンプル抗体の反応を蛍光標識二次抗体で検出する方法である。パネル細胞を用意する必要があるが、市販試薬と違って交差試験が可能である。

2施設がLIFTで参加しており、測定領域はクラスIのみである。二次抗体は1施設はIgG、もう1施設はIgGとIgMのミックスを使用した。サンプルSH1803のクラスI抗体は感度が低い方法では検出困難であるが、LIFTでは2施設とも検出でき

ていた。また、抗体特異性もFlowPRAやLAB-Screenに近い感度で検出できていた。ただし、抗原パターンとの関係でCローカス抗体特異性は認められていない。(表3,4)

LIFTは生体材料を抗原としているため、精製抗原試薬より生体内反応に近い状態で測定できていると考えられる。その感度もLCT法などの生体材料の方法より高く、データも数字で残せるので信頼性がある。ただし、LCT法などと比べ、操作方法が施設により一定していない。施設間の精度管理が必要となる方法の一つといえる。

表2 LATで検出した抗体特異性

判定スコアで反応が確定されたとされる抗原	
SH1801	クラスI A25 A34 B59 B62 B18 Cw16
	クラスII DR14 DQ8
SH1802	クラスI A25 A66 B58 B59 B18 B42 Cw16
	クラスII DR8 DR14
SH1803	クラスI B7 B48
	クラスII DR1 DR4 DR7 DR9 DR10 DR14 DR16 DR18 DQ4 DQ8 DQ9
SH1804	クラスI A26 A25 B35 B51 B58 B18
	クラスII -

表3 LIFTの抗体検出率

No.	Lab ID	2次抗体の品名&メ-カ-	標識抗体の品名&メ-カ-	Negative Control Serum	測定機器	細胞	HLAクラスI抗体			
							SH1801	SH1802	SH1803	SH1804
1	18S021		Jackson Immuno Research	自家	EPIX-XL	生細胞 (20パネル)	有	有	有	有
2	18S035	IgG: ベックマン インコールター IgM: KPL	CD3-PC5 CD19-PE:ベックマン インコールター	自家製	BD FACSCalibur	生細胞 (73パネル)	有	有	有	有
抗体有							2	2	2	2
抗体無							0	0	0	0
陽性率							## ##	## ##	## ##	## ##

表 4 LIFT で検出した抗体特異性

判定スコアで反応が確定されたとされる抗原								
SH1801	クラス I	A11	A26	A1	A31	A33		
SH1802	クラス I	A11	A26	B51	B52	B59	A24	B35
SH1803	クラス I	A24	B60	B61				
SH1804	クラス I	B35	B51	B52	B37	B58		

平成 18 年度 HLA 検査技術者認定試験に関する報告

太田正穂¹⁾, 石川善英²⁾, 石谷昭子³⁾, 大橋 順⁴⁾, 小河源悟⁵⁾, 柏瀬貢一⁶⁾, 木村彰方^{7),8)},
小林 賢⁹⁾, 高原史郎¹⁰⁾, 田中秀則⁶⁾, 徳永勝士⁴⁾, 中島文明²⁾, 西村泰治¹¹⁾,
平山謙二¹²⁾, 丸屋悦子¹³⁾, 屋部登志雄⁶⁾

(日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会試験問題検討部会)

- 1) 信州大学医学部法医学, 2) 日本赤十字中央血液研究所研究開発部, 3) 奈良県立医科大学法医学, 4) 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野, 5) 福岡大病院第4内科, 6) 東京都赤十字血液センター, 7) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, 8) 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, 9) 日本薬科大学生物学, 10) 大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学, 11) 熊本大学大学院医学系研究科免疫識別学教室, 12) 長崎大学熱帯医学研究所環境医学部門, 13) 特定非営利活動法人 HLA 研究所

日本組織適合性学会 HLA 検査技術者, 組織適合性指導認定制度による第3回の認定試験が, 第15回日本組織適合性学会大会中の平成18年9月24日に行われた。

第1回(平成16年度9月23日), 第2回(平成17年度10月2日)と同様, 試験問題の難易度を評価し, 合格ラインの参考にするため, 学会参加者に協力をお願いし, 無記名で模擬試験を行った。65名参加による模擬試験の結果は図1に示す通りであった。50問の平均点は28点, 標準偏差は6.3であった。50問のうち, 1問は不適切問題であったため, 全員正解とした。正解率ごとの問題数の分布を図2に示した。正解率10%以下の問題は2問(問8と問9), 正解率10%から20%の問題は2問(問33と問34)であった。

以下に正解率の低かった問題を解説する。

問8は HLA 遺伝子領域内の遺伝子の位置を問う問題であるが, もっともセントロメアに近い遺伝子は, 「RXRB」が正解であるが, 誤答として最も多かったのは「a: HLA-A」の21人, 次が「d: HLA-DPB1」の20人であった。正解の「c: RXRB」を選んだのは僅か5人で最も少ない選択肢であった。RXRBはRetinoid X Receptor, Betaの略で, レチノイン酸の役割を制御する核レセプター遺伝子である。HLA 遺伝子マップ(Nature 401: 921,1999, 移植・輸血検査学; 講談社サイエンティフィック: pp9)の伸張クラスII遺伝子領域に記載されているが, 特別な知識を持っていないと解けないようなものであり, 一般的な知識を問うものとしては難解であった。

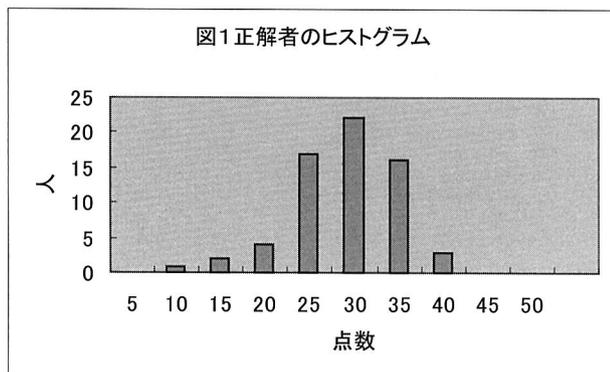


図1 正解者のヒストグラム

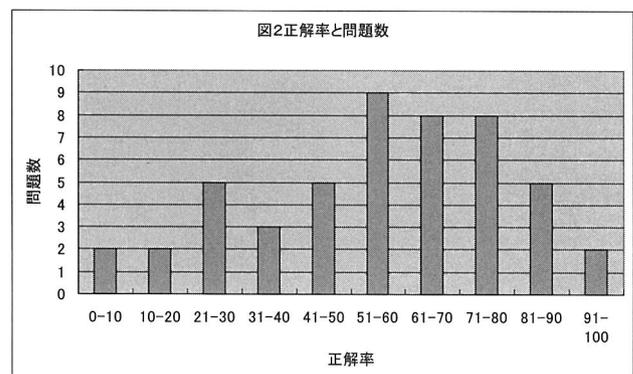


図2 正解率と問題数

と考えられる。

問9はHLA遺伝子の発現に関して誤りを選ぶ問題であるが、誤答として最も多かったのは「2. B細胞におけるHLA-DR分子とHLA-DQ分子の発現量はほぼ同程度である」と「3. 活性化T細胞はHLA-DR分子を発現する」の組み合わせを選択した19人であった。次に多かったのは17人が誤答した「4. インターフェロン γ はHLA-BおよびHLA-DR分子の発現を増強する」と「5. HLA-A分子は核を持たない細胞にも発現する」の組み合わせであった。インターフェロン γ により誘導されるCIITAはclass II遺伝子同様class I遺伝子に作用後機能を発揮し、Class I遺伝子の発現に関与している。また、B細胞上のDR分子、DQ分子の発現量はDR分子が多い。抗原に刺激されたTリンパ球は活性化されさまざまな機能をもつエフェクター細胞へと分化するが、このとき、ヒトやラットではクラスII抗原(DR抗原)が発現する。e)の選択肢で「5. HLA-分子は核を持たない細胞にも発現する」を誤りとしたのは、恐らく「クラスI抗原は総ての有核細胞に発現する」との知識が念頭にあったと考えられるが、輸血においてHLAクラスI抗原の適合性が必要な血小板は無核細胞である。すなわち核を持たないが、血小板にはクラスI抗原が細胞膜上に発現している。

問33は臓器移植における拒絶反応についての問題である。この問題で最も多く誤答したのは「c. 急性拒絶反応は液性拒絶反応が主体である」、であった。急性拒絶反応の主なメカニズムは、キラーT細胞が

ドナー移植片上の同種HLA分子を標的として破壊することによる細胞性拒絶反応である。また、次に多かった誤答選択肢はa)であったが、超急性拒絶反応は移植片への血流が再開されて数分後から24時間以内に起き、原因はレシピエントにドナーのもつHLA抗原と反応する抗-HLA抗体による抗原抗体反応や、異種動物の移植片を移植した場合に起きる補体免疫反応による。

今回使用した試験問題には、第1回(MHC11(3):299-311, 2005)第2回(MHC(3):283-294)で使用した問題のうちから6題を再度使用した。これらはいずれも前回60%以上の正答回答率と比較した。今回の正答率は、問題14(17年の問12, 正解率62%)が59%, 問題16(16年の問10, 正解率96%)が今回71%, 問18(17年の問15, 正解率60%)が69%, 問40(16年の問34, 正解率86%)が78%, 問42(16年の問37, 正解率93%)が97%であった。いずれの問題とも前回と同程度の正答正解率を示したことから、模擬試験を通じて会員の皆様に知識を再確認していただくとした試みは効果があがっていない可能性が考えられた。また、今回は試験問題の問題文、解答肢の形式統一を図り、1問平均1分(1時間以内に50問が)で解答できるような問題作成に心がけたが、後半に回答がない場合が見受けられた。さらに、今回の模擬試験の結果を参考に、問題量、難易度を含めて、資格試験に相応しい問題を作成することとしたい。

平成 18 年度 認定組織適合性指導者および認定 HLA 検査技術者試験問題

問 1 誤りはどれか。

1. HLA 抗原は頻回輸血患者血清による凝集反応から見つかった。
2. マウスで最初に見つかった MHC 抗原は H-2 抗原である。
3. 最初に見つかった HLA 抗原は HLA-A24 であった。
4. HLA の発見はマウスの MHC より早い。
5. Dausset は HLA 抗原の発見の功績により、ノーベル賞を授与した。

a) 1, 2 b) 1, 4 c) 2, 3 d) 3, 4 e) 4, 5

(正解 d, 64%)

問 2 HLA 抗体について正しいのはどれか。

- a. 抗 HLA モノクローナル抗体が反応するのは 1 種類の HLA 抗原である。
- b. ポリクローナル抗体は、特異性の異なるモノクローナル抗体の混合物である。
- c. ポリクローナル抗体は、必ず 2 種類以上の HLA 抗原と反応する。
- d. 抗血清はすべてポリクローナルである。
- e. 抗体産生者の T リンパ球をクローニングして抗体産生細胞を樹立できる。

(正解 b, 25%)

問 3 HLA 遺伝子について正しいのはどれか。

- a. 男性優位に発現する対立遺伝子型がある。
- b. ヘテロ接合体では 2 つの対立遺伝子が共に発現される。
- c. ホモ接合体では母親由来の対立遺伝子のみが発現される。
- d. T 細胞と B 細胞に発現する対立遺伝子の総数は同じである。
- e. 6 つの遺伝子座から発現する対立遺伝子の数は 3 から 12 の間である。

(正解 b, 66%)

問 4 誤りはどれか。

- a. ヒトゲノム中で観察される多型のうち、塩基配列中の一塩基が異なる多型を一塩基多型 (single nucleotide polymorphism) と呼ぶ。
- b. ハプロタイプ (haplotype) は、複数の遺伝子座の対立遺伝子の組合せとして表現される。
- c. 遺伝的連鎖は、特定の対立遺伝子の組合せが親から子へ一緒に遺伝する遺伝学的現象をいう。
- d. 連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) は、複数の遺伝子座における特定の対立遺伝子の組合せ頻度が高くなる集団遺伝学的な現象をいう。
- e. 連鎖不平衡の程度を減少させる主要因は、配偶子が次世代に伝えられる過程に起きる遺伝的浮動である。

(正解 e, 53%)

問 5 HLA 抗原型(タイプ)について正しいのはどれか。

1. 新しい HLA タイプとして命名されるには、血清学的な方法で他の HLA タイプと明確に区分される必要がある。
2. 公認された HLA タイプに、4 桁のものはない。
3. 抗原名は、遺伝子座ごとに数字で 1 番から順番に命名されているが、HLA-A 座と B 座では発見された経緯から、同じ番号は付けられていない。

4. HLA-D 抗原は、DNA タイピングによって見出された抗原である。
5. HLA-C 座の抗原名に付いている小文字の“w” (例: Cw1, Cw2) は、補体の成分の名称と区分するために付記されている。
a) 1, 2, 3 b) 1, 2, 4 c) 1, 3, 5 d) 2, 4, 5 e) 3, 4, 5 (正解 c, 68%)

問 6 HLA 対立遺伝子(アレル)の命名について正しいのはどれか。

1. 新たなアレルが命名されるためには、規定の部位の塩基配列を決定する必要がある。
2. アレル名の最初の 2 桁は、HLA タイプ(抗原名)を基に命名されている。
3. 現在、HLA-A*98, HLA-B*99 というアレル名が使われている。
4. アミノ酸置換を伴わないアレルは、アレル名の最初の 4 桁が同じである。
5. アミノ酸置換を伴わないアレルは、アレル名の 5 桁目だけで他のアレルと区分する。
a) 1, 2, 3 b) 1, 2, 4 c) 2, 3, 4 d) 2, 4, 5 e) 3, 4, 5 (正解 b, 69%)

問 7 HLA クラス II 領域の構造について誤りはどれか。

- a. HLA-DRB 遺伝子の数はハプロタイプにより異なることがある。
- b. HLA-DQB 遺伝子は HLA-DRA 遺伝子よりもセントロメア側に存在する。
- c. HLA-DMA, HLA-DMB 遺伝子もクラス II 領域内に存在する。
- d. HLA-DPA, HLA-DPB 遺伝子はクラス II 遺伝子のうち最もセントロメア側にある。
- e. HLA-DRB 遺伝子と HLA-DQB 遺伝子間では組み換えが頻繁に起きる。(正解 e, 69%)

問 8 第 6 染色体のセントロメアにもっとも近く位置する遺伝子はどれか。

- a. HLA-A
- b. HLA-F
- c. RXRB
- d. HLA-DPB1
- e. HLA-DPA1 (正解 c, 8%)

問 9 誤りはどれか。

1. CIITA (MHC class II transactivator) は HLA-A 遺伝子の発現に関係しない。
2. B 細胞における HLA-DR 分子と HLA-DQ 分子の発現量はほぼ同程度である。
3. 活性化 T 細胞は HLA-DR 分子を発現する。
4. インターフェロン γ は HLA-B および HLA-DR 分子の発現を増強する。
5. HLA-A 分子は核を持たない細胞にも発現する。
a) 1, 2 b) 1, 5 c) 2, 3 d) 2, 4 e) 4, 5 (正解 a, 9%)

問 10 誤りはどれか。

1. 遺伝性ヘモクロマトーシスの原因遺伝子 (*HFE*) はクラス III 領域内にマップされる。
2. HLA-B48 は MIC 遺伝子領域の欠失と強い連鎖不平衡にある。
3. 補体 C4 遺伝子とステロイド 21 水酸化酵素遺伝子はセットで遺伝子重複している。
4. ミスマッチ修復に関連する *MSH5* 遺伝子はクラス III 領域内にマップされる。
5. プロテアゾームサブユニット遺伝子 (*LMP1, LMP2*) はクラス I 領域にマップされる。

a) 1, 2 b) 1, 5 c) 2, 3 d) 2, 4 e) 4, 5 (正解 b, 29%)

問 11 胎盤トロホプラスト(栄養膜)上に発現しているクラス I 分子はどれか。

- a. HLA-A
- b. HLA-B
- c. HLA-DR
- d. HLA-DQ
- e. HLA-E

(正解 e, 88%)

問 12 HLA クラス II 分子の種類と分類について正しいのはどれか。

1. プライベート抗原とパブリック抗原の DRB β 鎖は、どちらも DRA 遺伝子がコードする DR α 鎖とヘテロダイマーを形成する。
2. ヒト DR 分子はマウス I-A 分子、ヒト DQ 分子はマウス I-E 分子に相当する。
3. DP 抗原の多型性は、DR 抗原と同様に β 鎖のみに見出される。
4. DMA 遺伝子と DMB 遺伝子の第 2 エキソンには、ほとんど多型性は見られない。
5. DQA1 遺伝子がコードする DQ α 鎖は、DQB2 遺伝子がコードする DQ β 鎖と会合する。

a) 1, 2 b) 1, 4 c) 2, 3 d) 2, 5 e) 3, 4 (正解 b, 24%)

問 13 HLA クラス II 分子が発現している細胞はどれか。

1. 赤血球
2. 単球
3. トロホプラスト
4. 樹状細胞
5. 好中球

a) 1, 3 b) 1, 5 c) 2, 4 d) 3, 5 e) 4, 5 (正解 c, 72%)

問 14 HLA クラス II 遺伝子の多型の特徴として正しいのはどれか。

- a. DRA 遺伝子座は DRB1 遺伝子座より対立遺伝子の数が多い。
- b. DQA1 遺伝子座は DQB1 遺伝子座より対立遺伝子の数が多い。
- c. DPA1 遺伝子座は DPB1 遺伝子座より対立遺伝子の数が多い。
- d. DRB 遺伝子座には DRB1 から DRB9 までの複数の遺伝子が存在する。
- e. DRB 遺伝子座に DRB1*08 遺伝子を持つヒトは同時に DRB3 遺伝子を持つ。

(正解 d, 59%)

問 15 HLA の対立遺伝子頻度と抗原頻度について正しいのはどれか。

1. 100 人の集団で HLA-A2 抗原を持つヒトが 40 人いる場合の抗原頻度は 40% である。
2. 100 人の集団で HLA-A*0201 を持つヒトが 40 人いる場合の対立遺伝子の頻度は 40% である。
3. HLA 領域の対立遺伝子の頻度と抗原頻度はほぼ同じ値である。
4. HLA 領域の対立遺伝子の頻度は抗原頻度のほぼ半分の値である。
5. HLA 領域の対立遺伝子の頻度と抗原頻度の間には何の関係もない。

a) 1, 3 b) 1, 4 c) 2, 4 d) 2, 5 e) 3, 4 (正解 b, 60%)

問 16 日本人で高頻度に観察される HLA ハプロタイプはどれか。

1. A1-B8-DR17
2. A24-B52-DR15
3. A24-B7-DR1
4. A33-B44-DR7
5. A33-B58-DR13

a) 1, 2 b) 1, 3 c) 2, 3 d) 2, 5 e) 3, 4

(正解 c, 71%)

問 17 MIC (MHC class I chain related) 遺伝子について誤りはどれか。

- a. MICA 遺伝子は高度な多型性を示す。
- b. MICA 遺伝子のエキソン 5 には 3 塩基の繰り返し配列多型が見られる。
- c. 遺伝子の大きさは、古典的 HLA クラス I とほぼ同じである。
- d. MICA および MICB 遺伝子の機能が全くないハプロタイプが存在する。
- e. HLA-B 遺伝子との連鎖不平衡が強い。

(正解 c, 24%)

問 18 HLA-クラス II 分子について正しいのはどれか。

1. MHC 拘束性を担う。
2. キラー T 細胞の CD8 分子と結合する。
3. サイトカインのレセプターとして作用する。
4. T 細胞レセプターの構成成分の一つとして機能する。
5. 樹状細胞, マクロファージ, B 細胞による抗原提示に関与する。

a) 1, 3 b) 1, 5 c) 2, 3 d) 2, 5 e) 3, 5

(正解 b, 69%)

問 19 ペプチド結合溝へのペプチドの結合について誤りはどれか

1. HLA-F は HIV 抗原ペプチドを結合する。
2. HLA-G は食作用により取り込んだ抗原ペプチドを結合する。
3. HLA-E は細胞内に存在する他の HLA 分子のシグナルペプチドを結合する。
4. HLA-A は腫瘍抗原ペプチドを結合し提示する。
5. HLA-DM はそれ自身ペプチドを結合しない。

a) 1, 2 b) 1, 5 c) 2, 3 d) 3, 4 e) 3, 5

(正解 a, 28%)

問 20 HLA クラス I 分子に結合しているペプチドに関して正しいのはどれか。

1. 結合しているペプチドは、アミノ酸が 7 つからなるものが多い。
2. 結合しているペプチドは、すべて疎水性アミノ酸からなる。
3. ウイルス感染細胞では、ウイルス由来のペプチドが結合していることがある。
4. 結合しているペプチドの N 末端は、ほとんどが疎水アミノ酸のバリンである。
5. 結合しているペプチドは、T 細胞によって認識されることがある。

a) 1, 2 b) 1, 4 c) 3, 4 d) 3, 5 e) 4, 5

(正解 d, 55%)

問 21 免疫反応に関して誤りはどれか。

1. 獲得免疫の活性化の特徴はそれ以前の抗原感作を必要とする。

2. 補体のレクチン経路や第二経路は自然免疫の一部として作用している。
 3. マクロファージや好中球は抗体が存在しない状況下でも食作用を行うことができる。
 4. HLA 分子は自然免疫には関与せず，獲得免疫における抗原提示に関与する。
 5. 自然免疫を活性化するのは，多くの微生物の細胞膜表面上に共通して存在するタンパク質の数個のアミノ酸である。
- a) 1, 3 b) 2, 5 c) 3, 4 d) 3, 5 e) 4, 5

(正解 e, 52%)

問 22 NK (ナチュラルキラー)細胞について誤りはどれか。

1. NK 細胞はがん細胞や感染細胞を傷害する。
 2. NK 細胞は同種細胞を傷害しない。
 3. HLA-C, HLA-E や MICA 抗原は NK 細胞受容体に認識される。
 4. HLA クラス I 抗原を消失した細胞は NK 細胞から攻撃される。
 5. HLA クラス II 抗原を消失した細胞は NK 細胞から攻撃される。
- a) 1, 2 b) 2, 3 c) 2, 5 d) 3, 4 e) 4, 5

(正解 c, 53%)

問 23 正しいのはどれか。

1. TAP は小胞体内でクラス I 分子にペプチドを載せる働きをする。
 2. TAP 欠損はクラス I 発現欠損症(ベアーリンフォサイト症候群)となる。
 3. TAP は小胞体内でクラス II 分子にペプチドを載せる働きをする。
 4. TAP はエンドゾーム内でクラス I 分子にペプチドを載せる働きをする。
 5. TAP はエンドゾーム内でクラス II 分子にペプチドを載せる働きをする。
- a) 1, 2 b) 2, 3 c) 2, 5 d) 3, 4 e) 4, 5

(正解 a, 48%)

問 24 正しいのはどれか。

1. 抗原提示細胞には T 細胞, NKT 細胞などがある。
 2. 抗原提示細胞には NK 細胞, 肥満細胞などがある。
 3. 抗原提示細胞は抗体分子と結合した抗原を T 細胞に認識させる。
 4. 抗原提示細胞には樹状細胞 (DC), マクロファージ, B 細胞などがある。
 5. 抗原提示細胞は HLA 分子上の抗原ペプチドを T 細胞に認識させる。
- a) 1, 2 b) 2, 3 c) 2, 5 d) 3, 4 e) 4, 5

(正解 e, 77%)

問 25 正しいのはどれか。

1. HLA-E 抗原は NK 細胞受容体 NKG2D に認識される。
 2. HLA-E 抗原は NK 細胞受容体 KIR3DL1 に認識される。
 3. HLA-E 抗原は NK 細胞受容体 NKG2A に認識される。
 4. HLA-E 抗原にはクラス I のシグナルペプチドが結合している。
 5. HLA-E 抗原にはクラス II のシグナルペプチドが結合している。
- a) 1, 2 b) 2, 3 c) 2, 5 d) 3, 4 e) 4, 5

(正解 d, 73%)

問 26 T 細胞レセプターについて誤りはどれか。

- a. 抗体の場合と同様に，T 細胞レセプターも定常部と可変部により構成される。

- b. 多くの末梢成熟 T 細胞に発現する T 細胞レセプターは、 α 鎖と β 鎖により構成されている。
- c. T 細胞レセプターは抗体と同様に抗原分子を直接認識して、これに結合できる。
- d. 胸腺における T 細胞の分化過程で、T 細胞レセプター遺伝子の再構成がおこる。
- e. T 細胞レセプターは通常、抗原ペプチドを認識する際に、同時に自己の HLA をも認識する。

(正解 c, 58%)

問 27 削除

問 28 胸腺および末梢における T 細胞の免疫寛容の誘導について誤りはどれか。

- 1. 胸腺では、自己ペプチド/MHC 複合体に強く反応する自己応答性 T 細胞が排除される。
- 2. 胸腺における T 細胞の免疫寛容の獲得には、T 細胞レセプターが重要な役割を担っている。
- 3. 胸腺に MHC を発現しない個体でも、T 細胞は正常に分化して末梢に供給される。
- 4. 骨髄移植では、ドナーの T 細胞がレシピエントのアロ抗原に対して免疫寛容を獲得するため、GVH (移植片対宿主)反応は誘導されない。
- 5. 胸腺以外の末梢組織に発現する自己蛋白質に対しても、T 細胞は免疫寛容を獲得する。

a) 1, 2 b) 2, 3 c) 2, 5 d) 3, 4 e) 4, 5

(正解 d, 73%)

問 29 感染症に関する記述のうち正しいのはどれか。

- 1. HLA クラス I 欠損症は特に真菌感染に対する感受性が高い。
- 2. ウイルスなどの細胞内寄生病原体は、その抗原がペプチドに分解され、HLA クラス I 分子によって提示される。この結果、 $CD8^+$ T 細胞は感染細胞を認識、傷害することによってウイルスを除去する。
- 3. ライター症候群はある種の感染症の後に発症することが多いが、その発症には HLA-B27 が関与すると推定される。
- 4. 結核菌、クラミジアなどの食胞に寄生する病原体の抗原は HLA クラス I 分子によって提示されるため、 $CD8^+$ T 細胞に認識され感染細胞の傷害によって除去される。
- 5. グラム陰性菌の外膜成分である内毒素 (LPS) は HLA 分子に結合し、多くの T 細胞を刺激する。

a) 1, 2 b) 2, 3 c) 2, 5 d) 3, 4 e) 4, 5

(正解 b, 31%)

問 30 T 細胞が示すアロ反応性について誤りはどれか。

- a. T 細胞が示すアロ反応性は、同種個体間での臓器移植の際の拒絶反応の原因となる。
- b. 個体間で異なる HLA は、T 細胞にアロ反応性を誘導する主要な抗原のひとつである。
- c. 免疫抑制剤の使用は、臓器移植の際の T 細胞によるアロ反応を抑えるのに有効であると同時に、感染症へのリスクを高める。
- d. HLA の遺伝子型が完全に一致している個体間でも、臓器移植に際して T 細胞にアロ反応が誘導される。
- e. 臓器移植の際の拒絶反応に、B 細胞が産生する抗体が関与することは稀である。

(正解 e, 83%)

問 31 臓器移植の適応について誤りはどれか。

- a. ドナーが癌患者の場合、臓器を提供できる。
- b. ドナーが感染症の場合、臓器提供は出来ない。
- c. 移植される臓器の種類によりドナー選択の条件が異なる。
- d. ABO 型不適合、PRA 陽性でも移植は出来る。

- e. レシピエントは年齢や原疾患など移植条件が規定されている。

(正解 a, 72%)

問 32 臓器移植の際に行われる検査で正しいのはどれか。

- 全ての臓器移植は HLA タイピングを行いドナー・レシピエントの選択を行う。
- ドナー・レシピエント間の HLA クラス I 適合度が一番重要である。
- 心移植や肝移植でも腎移植と同様に HLA タイピング結果によってドナー・レシピエントの選択が行われる。
- 直接交差試験は全ての臓器移植で行われる。
- 生体移植では MLR は重要な検査の一つである。

(正解 e, 31%)

問 33 臓器移植における拒絶反応について正しいのはどれか。

- 超急性拒絶反応は細胞性拒絶反応が主体である。
- 急性拒絶反応は治療抵抗性である。
- 急性拒絶反応は液性拒絶反応が主体である。
- 慢性拒絶反応は高齢者ドナーに多い。
- 慢性拒絶反応は治療反応性である。

(正解 d, 12%)

問 34 死体腎移植のレシピエント選択において HLA の取り扱いで正しいのはどれか。

- クラス I, クラス II とも同等でドナーとレシピエントの適合数が多いものを上位とする。
- クラス I 抗原よりクラス II 抗原を優先し, ドナーとレシピエントの適合数が多いものを上位とする。
- クラス I 抗原よりクラス II 抗原を優先し, ドナー側のミスマッチ数が少ないものを上位とする。
- クラス II 抗原よりクラス I 抗原を優先し, ドナーとレシピエントの適合数が多いものを上位とする。
- クラス II 抗原よりクラス I 抗原を優先し, ドナー側のミスマッチ数が少ないものを上位とする。

(正解 c, 20%)

問 35 HLA と輸血後 GVHD の関係で誤りはどれか。

- 患者には特定の HLA ハプロタイプが多い。
- 日本人が有する HLA ホモ接合体は 1 万人に一人の割合である。
- 患者が HLA ヘテロ, ドナーが HLA ホモの組み合わせの時に起こりやすい。
- 患者が HLA ホモ, ドナーが HLA ヘテロの組み合わせの時に起こりやすい。
- HLA クラス I, II 抗原が関与する

- a) 1, 2 b) 2, 4 c) 2, 5 d) 3, 4 e) 4, 5

(正解 b, 49%)

問 36 日本骨髄バンクを介した非血縁者間骨髄移植において重症急性 GVHD の発症に関連のあることが判明しているドナーと患者間の HLA 遺伝子型不適合座はどれか。

- HLA-A
- HLA-DPB1
- HLA-C
- HLA-E
- HLA-B

- a) 1, 2, 4 b) 1, 3, 5 c) 2, 3, 4 d) 2, 3, 5 e) 3, 4, 5

(正解 b, 94%)

問 37 HLA と親子鑑定について誤りはどれか。

- a. HLA 遺伝子は親子鑑定に有効な遺伝形質である。
- b. 親子鑑定に用いる時はハプロタイプで考えることが望ましい。
- c. 父権肯定確率を計算する遺伝子頻度は、その民族のものを使う。
- d. HLA-A 遺伝子よりも HLA-B 遺伝子の方が親子鑑定には有効である。
- e. HLA で否定されれば、男の父権は否定できる。

(正解 e, 56%)

問 38 先端医療に関して正しいのはどれか。

- 1. 薬剤応答性の個人差には遺伝要因は関与しない。
 - 2. 輸血・移植医療はオーダーメイド医療のさきがけといえる。
 - 3. Steven-Johnson 症候群と HLA との関係には集団差が見られない。
 - 4. あるエイズ治療薬への過敏症と HLA との関連が報告されている。
 - 5. 再生医療においては HLA 検査の必要性はなくなる。
- a) 1, 5 b) 2, 3 c) 2, 4 d) 3, 4 e) 4, 5

(正解 c, 81%)

問 39 次の疾患のうち、HLA 遺伝子検査が診断上の意義をもつのはどれか。

- 1. 2 型糖尿病
 - 2. GVHD
 - 3. ナルコレプシー
 - 4. 高血圧
 - 5. 強直性脊椎炎
- a) 1, 2, 5 b) 1, 3, 4 c) 2, 3, 4 d) 2, 3, 5 e) 3, 4, 5

(正解 d, 81%)

問 40 HLA タイピングの歴史について誤りはどれか。

- a. HLA タイピング法が多数開発された今日では、目的や時間、費用に応じて最適な方法を選択することが可能となった。
- b. DNA タイピングの開発により、タイピングに要する時間が短縮されることとなった。
- c. 血清学的検査法、細胞学的検査法、DNA タイピングのうち、もっとも技術的な熟達が必要とされるのは、細胞学的検査法である。
- d. 最近では、現在用いられている HLA タイピング法を使用すれば、全ての抗原遺伝子型を検出できるようになった。
- e. リンパ球細胞毒試験 (LCT) 法の開発は、HLA 抗原タイピングの普及に大きく貢献した。

(正解 d, 78%)

問 41 前感作抗体の検出に有効な PRA (Panel reactive antibody) 検査について誤りはどれか。

- a. 検出には HLA がタイプされたリンパ球を用いることがある。
- b. 検出には特異性が同定された抗血清を用いる。
- c. 輸血、妊娠後などに陽性になることがある。
- d. 自己抗体を検出することがある。
- e. PRA 検査陽性者は移植予後が悪い。

(正解 b, 70%)

問 47 移植医療における交差試験について正しいのはどれか。

- a. 移植医療における交差試験はドナー細胞と患者血清との試験で十分である。
- b. 移植医療における交差試験はドナー細胞と患者血清の試験とドナー血清と患者細胞との試験の両方が必須である
- c. 移植医療における交差試験は移植の種類別，ドナーの種類ごとに必要とされる試験が異なるので注意を要する。
- d. 移植医療における交差試験はいかなる場合も必須である。
- e. 移植医療における交差試験は常に最高感度のテスト法を選択すべきである。 (正解 c, 57%)

問 48 マイナー組織適合性抗原の臨床応用について正しいのはどれか。

- 1. 移植医療におけるマイナー組織適合性抗原の臨床的意味はほとんど不明である。
 - 2. 造血幹細胞移植において，マイナー組織適合性抗原の臨床的意味は主要組織適合性抗原がもつ意味と同等に重要である。
 - 3. 造血幹細胞移植において，マイナー組織適合性抗原の臨床応用法として養子免疫療法がある。
 - 4. 移植医療においてマイナー組織適合性抗原検査は必須である。
 - 5. 臓器移植においてマイナー組織適合性抗原の臨床的意味の検討は無駄である。
- a) 1, 2 b) 2, 3 c) 2, 4 d) 3, 4 e) 3, 5 (正解 b, 68%)

問 49 ケース・コントロール研究において，疾患感受性(疾患の有無)と遺伝子多型(遺伝子型)との関連を検討するのに適した統計学的検定法はどれか。

- a. Kruskal-Wallis 検定
- b. 二標本 t 検定
- c. Mann-Whitney U 検定
- d. χ^2 独立性の検定
- e. 一標本 t 検定 (正解 d, 46%)

問 50 有意水準 α で検定を n 回行うと，偶然により正しい帰無仮説が棄却される可能性が高くなる。このような偽陽性を避けるために，一般的に行われる有意水準の補正として正しいものはどれか。

- a. $\alpha \cdot n$
- b. α/n
- c. α^*n
- d. $n - \alpha$
- e. n/α (正解 b, 40%)

平成 18 年度認定 HLA 検査技術者登録名簿 (敬称略)

(平成 18 年 9 月 25 日から平成 23 年 9 月 24 日)

認定番号	氏 名
G06002	林 律子
G06003	池田 通代
G06004	松山 宣樹
G06005	野田日登美
G06006	水野美紀子

日本組織適合性学会
平成 17 年度 決算報告書

自 平成 17 年 4 月 1 日
至 平成 18 年 3 月 31 日

(収入の部)	予 算	決 算	差 異
会 員 年 会 費	3,500,000	3,398,000	-102,000
寄 付		690,000	690,000
和 解 金		249,235	249,235
学 会 誌 広 告 費	1,000,000	820,000	-180,000
学 会 誌 販 売	100,000	154,477	54,477
利 息	30	19	-11
当 期 収 入 合 計	4,600,030	5,311,731	711,701
前 年 度 繰 越 金	5,541,755	5,541,755	0
収 入 合 計	10,141,785	10,853,486	711,701
(支出の部)	予 算	決 算	差 異
大 会 援 助 金	1,000,000	1,000,000	0
学 会 誌 作 成 費	2,700,000	2,933,507	-233,507
学 会 賞 金	500,000	204,187	295,813
倫 理 委 員 会		165,174	-165,174
損 金 処 理		4,224,323	-4,224,323
旅 費	100,000	95,645	4,355
会 議 費	20,000		20,000
通 信 費	300,000		300,000
事 務 局 費	300,000	318,000	-18,000
事 務 費	150,000	132,909	17,091
当 期 支 出 合 計	5,070,000	9,073,745	-4,003,745
次 期 繰 越 金	5,071,785	1,779,741	3,292,044
支 出 合 計	10,141,785	10,853,486	-711,701
当 期 収 支 差 額	-469,970	-3,762,014	3,292,044

(繰越内訳 振替口座: 1,135,217 普通預金: 602,709 現金: 41,815)

平成 17 年度日本組織適合性学会会計を監査し、適正であったことを認めます。

平成 18 年 9 月 24 日 日本組織適合性学会 監事

片桐 一
笹月 健彦

日本組織適合性学会
平成 17 年度 認定制度決算報告書

自 平成 17 年 4 月 1 日
至 平成 18 年 3 月 31 日

(収入の部)	予 算	決 算	差 異
QC ワークショップ	600,000	372,000	228,000
講 習 会	5,000	164,000	-159,000
申 請 料	80,000	135,000	-55,000
利 息	30	0	30
当 期 収 入 合 計	685,030	671,000	14,030
前 年 度 繰 越 金	3,746,280	3,867,188	-120,908
収 入 合 計	4,431,310	4,538,188	-106,878

(支出の部)	予 算	決 算	差 異
QC ワークショップ	200,000	273,860	-73,860
事 業 経 費	100,000	257,620	-157,620
(実技研修費委託費)	50,000	0	50,000
(会 場 費)	100,000	0	100,000
(講 師 費)	200,000	0	200,000
旅 費	200,000	149,570	50,430
(会 議 費)	60,000		60,000
(通 信 費)	20,000		20,000
事 務 費	30,000	245,589	-215,589
当 期 支 出 合 計	960,000	926,639	33,361
次 期 繰 越 金	3,471,310	3,611,549	-140,239
支 出 合 計	4,431,310	4,538,188	-106,878
当 期 収 支 差 額	-274,970	-255,639	-19,331

(繰越内訳 振替口座: 3,559,800 普通預金: 38,299 現金: 13,450)

平成 17 年度日本組織適合性学会認定制度会計を監査し、適正であったことを認めます。

平成 18 年 9 月 24 日 日本組織適合性学会 監事

片桐 一
笹月 健彦

日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定

1. 投稿規定

1.1. 原稿様式

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

1.2. 原著論文

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

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

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

HLA-Cw8 のサブタイプ “Cw8N” の塩基配列および

HLA-B 座との関連分析

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

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

枚数は特に指定しないが、速報的な短報(全体で、2,000~3,000字、出来上りA4版で2~4枚程度)を中心とする。もちろん、full article も歓迎する。また、新対立遺伝子、日本人に認められた希な対立遺伝子に関する報告も受け付ける。なお、参考文献(References)の記載については、下記1.5を参照すること。原稿の内容は以下に従って記載し、オリジナル1部にコピー3部を添えて、編集長宛(下記3参照)に送付する。

日本語で投稿する場合、内容は二頁目よりはじめ、要約、はじめに、材料と方法、結果、考察、参考文献の順に記載する。また、要約の末尾に日本語のキーワード(5語以内)を加える。脚注は適宜、設けてもよい。本文の末尾に別項で英語のタイトル、著者名、所属(様式は上述に従う)、次の項に英語の要約とKey words(5語以内)をつける。

英語で投稿する場合、内容は二頁目よりはじめ、Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Referencesの順に記載する。Summaryの末尾に英語のKey words(5語以内)を加える。脚注は適宜、設けてもよい。本文の末尾に別項で日本語のタイトル、著者名、所属、次の項に日本語の要約とキーワード(5語以内)をつける。

1.3. 総説、シリーズその他

編集委員会からの依頼を原則とするが、会員からの投稿も大いに歓迎する。日本語を原則とする。タイトル、著者名、所属は上記1.2.の通りにしたが、要約と要約の末尾に日本語で5語以内のキーワード

を添える。英語で投稿する場合にも、日本語でタイトル、著者名、所属、要約、5語以内のKeywordを加える。その他の体裁は自由とするが、構成がいくつかの章、節などから成る場合には、次の番号に従い、適当な見出しを添える。

1. 2. 3. 4. ……

1.1. 1.2. 1.3. ……

1.1.1. 1.1.2. 1.1.3. ……

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

1.4. 校正

校正は編集委員が行い、特別な場合を除き、執筆者は校正を行わない。

1.5. 参考文献

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

1. Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, *et al.*: Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asian. *Tissue Antigens* **57** (1): 1-8, 2001.

2. Tokunaga K, Imanishi T, Takahashi K, *et al.*: On the origin and dispersal of East Asian populations as viewed from HLA haplotypes. *Prehistoric Mongoloid Dispersals* (eds. Akazawa T, Szathmary EJ), Oxford University Press, p. 187-197, 1996.
3. 徳永勝士, 尾本恵市, 藤井康彦ら: HLA に連鎖した遺伝標識に関するハプロタイプ調査, 移植, **18**: 179-189, 1983.
4. 徳永勝士, 大橋 順: 疾患遺伝子の探索. わかる実験医学シリーズ「ゲノム医科学がわかる」(菅野純夫編), 羊土社, p. 48-55, 2001.

2. 別刷

原著論文については、別刷は有料とする。その費用は部数、頁数による。

3. 原稿送付先

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

TEL: 03-5841-3692

FAX: 03-5802-2907

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

編集後記

私が猪子英俊先生の後任としてMHC誌の編集長を拝命して4年間に過ぎました。この間、編集委員のご協力をいただいて学会員の皆様に役立つ学会誌を目指して参りました。HLAの血清学的分類、NKレセプター遺伝子群の多様性、MHCの比較ゲノムシリーズなどの総説、QCWSレポート、認定試験問題の解答・解説集などある程度ご期待に添えたかと思いますが、皆様からの投稿論文数が少ないままに任務を終えるのは心残りです。

幸いにして、高原史郎新編集長は情熱にあふれ、また編集委員会が関西地域に移ることから、MHC誌に新たな方向性が打ち出されて一層の発展を見せてくれることと思います。学会員の皆様には今後も引き続き、MHC誌へのご支援とご協力をお願いいたします。

最後に、これまで編集委員を務めて下さった先生方、校正担当の石川弘恵さん、そして編集事務を担当下さった小松崎のぞみさんに心より御礼申し上げます。

徳永 勝士

「MHC」バックナンバー

一冊¥2,000にて購入できます。学会事務局までお問い合わせ下さい。なお在庫僅少の号もありますので、万一品切れの際にはご容赦ください。

入・退会、所属・住所・連絡メールアドレス変更

各種の申請は、学会事務局で受け付けます。

日本組織適合性学会事務局

〒101-0062

東京都千代田区神田駿河台2-3-10

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態分野内

電話 03(5280)8054

FAX 03(5280)8055

電子メール jshijimu.tis@mri.tmd.ac.jp

日本組織適合性学会ホームページ

学会活動に関する情報やHLA遺伝子の塩基配列情報が利用できます。

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

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

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

2007年1月31日発行 13巻3号, 2007

定価 2,000円

発行 日本組織適合性学会(会長 木村 彰方)

編集 日本組織適合性学会編集委員会(編集担当理事 徳永 勝士)

平成8年7月24日 学術刊行物認可

日本組織適合性学会事務局(事務担当理事 十字 猛夫)

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野内

印刷・研究社印刷株式会社

〒352-0011 埼玉県新座市野火止7-14-8