

第11回 HLA-QC ワークショップレポート

第11回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過—

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),
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⁾日本薬科大学生物科学, 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 11 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 18 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が, 学会に設置した研究倫理審査委員会による検討と承認を受けた運営方法に従って, 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 18 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 19 年 3 月の締め切りまでに 171 名(67 施設)から参加申し込みがあった(後日, 抗体 QC に 1 施設 1 名の追加があった)。参加申し込み, 参加者との連絡のいずれについても原則としてインターネットを利用 (HP からの申し込み, 電子メール連絡) することとして運営した。参加者数が確定した 4 月に, QCWS 部会において具体的なサンプルの選定, QCWS のテーマ(後述)の決定と電子媒体を用いたデータ収集の方法を決定した。ついで, 4 月上旬から中旬にかけて, 同意書・誓約書を得た後に施設を単位としてサンプルを送付した。5 月上旬にデー

タ入力フォーマットを送付し, 6 月上旬のデータ送付締め切りまでに 67 施設からデータが回収された。それらの生データはとりまとめた上で 8 月上旬に参加者に配布されるとともに各解析担当者に送付され, 8 月下旬まで解析された。今年度から, 解析結果を参加者に直接配布するのではなく, QCWS 部会の HP 上に解析が終了した項目ごとに順次掲載し, 参加者が必要に応じてダウンロード出来る形式とした(表 1)。さらに, 今後の QCWS 運営の参考とするために, QCWS 集会当日に参加者へのアンケート調査を実施した。

2. QCWS のテーマ

組織適合性技術者認定制度の主旨にそった QCWS のテーマを設定することとして, 今回の QCWS のテーマを QCWS 部会で検討した結果, 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) 明確な抗体特異性を有する IgM 抗体, (2) 明確な抗体特異性を有する IgG 抗体, (3)

表 1 第 11 回 QCWS の実施経過

平成 18 年 9 月	QCWS 部会において第 11 回 QCWS の方針決定 DNA-QC 部門；1) 日常的に遭遇しないタイプ (主に A, B 座)、2) ろ紙付着細胞サンプル、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) 明確な抗体特異性を有する IgM 抗体、2) 明確な抗体特異性を有する IgG 抗体、3) 広範囲に抗体特異性を有するサンプル、4) C ローカス抗原に対する抗体、5) HLA クラス II 抗原に対する抗体
平成 18 年 11 月	第 10 回 QCWS 案内の作成、 「MHC」および HP への掲載
平成 19 年 3 月	参加申し込み；67 施設 (171 名) DNA-QC 参加：62 施設、抗体 QC 参加：40 施設
平成 19 年 3 月-4 月	QCWS 部会内各部門において具体的なサンプルの決定： 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 月上旬-中旬	倫理審査委員会での審議に基づき、同意・誓約書を取得した上で、QCWS サンプルの配布
平成 18 年 5 月上旬	データ入力フォーマット送付
平成 18 年 6 月上旬	データ回収締め切り
平成 18 年 6 月—8 月	参加者への生データ送付、解析担当者によるデータ解析
平成 18 年 8 月中旬—下旬	QCWS 部会 HP 開設、解析結果の掲載

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
H1901	ゲノム DNA 溶液	4ug
H1902	ゲノム DNA 溶液	4ug
H1903	WGA DNA 溶液	2ug
H1904	ゲノム DNA 溶液	4ug
H1905	ろ紙付着細胞	3x10 ⁵ 細胞
H1906	ろ紙付着細胞	3x10 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	抗体特異性 (LCT 法)	抗体力価 (LCT 法)	抗体性状
SH1801	抗血清	A3 A11 A32 A74	x1	HLA クラス I-IgM
SH1802	抗血清	B18 B35 B37 B51 B5102 B52 B53	x8~32	HLA クラス I-IgG
SH1803	抗血清	A32 Bw4 B46 Cw9 Cw10	不明	HLA クラス I-IgG HLA クラス I-IgM?
SH1804	抗血清	Cw1	x1	HLA クラス I-IgG HLA クラス II-IgG

広範囲に抗体特異性を有するサンプル、(4) C ローカス抗原に対する抗体、(5) HLA クラス II 抗原に対する抗体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ため、

日本組織適合性学会研究倫理審査委員会によって倫理的側面を検討し、承認された運営方法に従った。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入れられ

るもの)を用いることとし、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。

3. 参加者・参加施設

参加者は総数 172 名であり、以下の 68 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減であった。なお、当日集会のみの参加が 29 名あった。

参加施設名：札幌北楡病院 臨床検査部、岩手医科大学付属病院 免疫血清検査室、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 検査部検査三課、株式会社ベリタス 技術営業部、日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所 研究開発部 研究三課、東京都赤十字血液センター 検査部 検査三課、東京女子医大 腎センター移植免疫研究室、東京女子医科大学 泌尿器科、株式会社 三菱化学ビーシーエル 遺伝子検査部、株式会社 エスアールエル 遺伝子検査課、北里大学病院 臨床検査部 DNA 検査室、公立大学法人 横浜市立大学付属病院 輸血部、株式会社 保健科学研究所 特殊分析センター 染色体遺伝子関連・細免検査グループ、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 基礎医学系分子生命科学、東海大学医学部 教育研究支援センター、東海大学医学部付属病院 細胞移植再生医療科、千葉東病院 HLA 検査室、千葉県赤十字センター 検査二課、自治医科大学付属病院 輸血・細胞移植部、株式会社ビー・エム・エル 特殊分析部 特殊技術課、防衛医科大学校病院 検査部研究室、長野赤十字病院 検査部、信州大学医学部 法医学教室、株式会社 医学生物研究所 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 組織適合検査室、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、三重大学医学部付属病院 輸血部、大阪府赤十字センター 検査二課、

大阪市立大学医学部付属病院 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、国立循環器病センター・臨床検査部、関西医科大学病院輸血部、NPO 法人 HLA 研究所、京都大学医学部付属病院 輸血細胞治療部、兵庫県赤十字センター検査一課検査三係、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 技術検査課、県立広島病院 臨床研究検査科、広島大学病院 輸血部、湧永製薬(株)バイオ事業開発部 製品開発グループ、香川県立中央病院 中央検査部、徳島大学病院 輸血部、徳島赤十字病院検査部、高知医療センター 三菱化学 BCL ラボ、愛媛県立衛生環境研究所 疫学情報科、福岡大学医学部 内科学第四、福岡赤十字病院 HLA 検査室、福岡県赤十字血液センター検査二課、佐賀県立病院好生館 検査科、長崎大学国際連携研究戦略本部、国立病院機構 長崎医療センター 輸血管理室、熊本県赤十字センター 検査課、大分県立病院 輸血部、金沢医科大学病院 中央臨床検査部、富山大学付属病院 輸血・細胞治療部、立川総合病院 臨床検査科、新潟市民病院 臨床検査課、新潟県赤十字血液センター 技術部 検査課、福島県立医科大学付属病院 輸血・移植免疫部、宮城県赤十字血液センター 検査課、仙台社会保険病院 検査部、山形県立中央病院 輸血部(以上のべ 68 施設、郵便番号順)

4. QCWS に関するアンケート調査

QCWS 集会時に参加者へのアンケートを実施した。有効回答数は 41 であり、以下の通りの結果であった。

Q1 あなたについてお聞かせください

1. 所属組織

病院 48.3%，血液センター 24.4%，大学 19.5%，受託検査センター 7.3% 他

2. 職種

実務者 80.5% 他

3. HLA との関わり

8 年以上 51.2%，4-7 年 29.3%，1-3 年 19.5%

4. QCWS (実技)参加

4-7 回 46.3%，1-3 回 34.1%，初めて 7.3% 他

5. QCWS (集会)参加

4-7 回 46.3%, 1-3 回 26.8%, 初めて 17.1% 他

Q2 DNA-QC についてお聞かせください

1. 今年度 DNA-QC

参加 70.7%, 不参加 22.0%, 以前参加・今年度不参加 7.3%

2. DNA-QC の数

ちょうどいい 75.6%, 少ない 7.3%

3. DNA-QC のサンプル数

ちょうどいい 61.0%, 多い 17.1%, 少ない 4.9%

4. DNA-QC のサンプル

日本人にありふれたタイプ 61.0%, 外国人にありふれたタイプ 61.0%, 日本人で珍しいタイプ 58.5%, 極めて珍しいタイプ 4.9%

Q3 抗体 QC についてお聞かせください

1. 今年度の抗体 QC に

参加した 48.8%, 参加していない 31.7%, 以前参加・今年度不参加 14.6%

2. 抗体 QC は年に 1 度だけですが, この数は?

ちょうどいい 58.5%, 少ない 9.8%

3. 抗体 QC のサンプルは例年 6 本ですが, この数は?

ちょうどいい 58.5%, 多い 7.3%

4. 抗体 QC のサンプルとして今後使用して欲しいものは? (複数回答可)

日本人にありふれた抗原に対する抗血清 51.2%, 移植患者由来の抗血清 36.6%, 日本人で珍しい抗原に対する抗血清 31.7%, HLA 以外の移植関連抗原に

対する抗血清 14.5%, 外国人にありふれた抗原に対する抗血清 12.2%, きわめて珍しい抗原に対する抗血清 4.9%

Q4 今後の QCWS についてお聞かせください

1. 今後 QCWS に参加されますか?

今後とも参加 80.5%, 未定 14.5%

5. まとめ

QCWS は組織適合技術者認定制度委員会の担当となったため, 昨年度までと同様, 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, あらかじめ生データ資料を CDR で送付することによって, 参加者が全体の解析も自身で可能とした。さらに, 今年度から QCWS 部会のホームページを立ち上げ, ここに解析結果を掲載することで QCWS 集会に参加していない集会でも全体の解析結果を閲覧可能とした。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。また, 今回初めて参加者へのアンケート調査を実施した。有効回答数は 41 と少なかったが, 今後に関する希望等を含めある程度の意見が得られたため, 試料取扱いの倫理的側面を考慮しつつ, 認定制度の主旨を生かした QCWS を行っていく上での参考とする予定である。

第 11 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—

平田康司 (岡山県赤十字血液センター検査課), 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

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

およびクラス 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 の正解率を中心と

表 1 検査方法別およびローカス別の検査結果報告施設数

	ローカス							
	A	B	C	DRB1	DRB3/4/5	DQA1	DQB1	DPB1
提出データ数(全62施設)	61	61	40	61	35	3	27	5
SSO	45	45	25	45	22	1	12	3
SSP	18	19	15	20	14	1	13	
検査方法	8	8	8	10	10	2	2	3
SBT				2	2	1	2	
RFLP				1	1		1	
SSCP							1	

表 2 検査方法・方法数およびローカス別の検査結果報告施設数

	ローカス							
	A	B	C	DRB1	DRB3/4/5	DQA1	DQB1	DPB1
提出データ数(全62施設)	61	61	40	61	35	3	27	5
SSO	35	34	17	29	20	1	9	2
SSP	14	14	12	12	13	1	12	
SBT	2	2	3	3			2	2
RFLP	4	5	3	7	1	1	1	
SSO+SSP	6	6	5	6				1
SSO+SBT				2		1		
SSO+RFLP				1				
SSP+SBT				1	1			
SSO+SSCP				1	1			
SSO+SSP+SSCP								
SSO+SBT+RFLP								

表 3 検査方法・方法数およびローカス項目の検査結果報告施設数

検査方法	ローカス組																合計	検査方法数
	ABC DRB1 DRB3/4/5 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1	ABC DRB1 DQA1 DQB1 DPB1		
SSO	1																27	
SSP	7																13	
SBT																	4	
SSO+SSP																	1	
SSO+SBT	1																9	
SSO+RFLP																	5	
SSP+SBT																	2	
SSO+SSP+SSCP																	1	
SSO+SBT+RFLP																	1	
合計	1	14	1	1	1	3	6	3	10	1	16	4	1	1	1	62	62	

WGA(whole genome amplification)を使用した施設数を()にて示した。

表 4 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	H1901	A24	A*2402 (A*24)	60	60	100.0%	54	54	100.0%
	H1902	A1	A*0101 (A*01)	61	59	96.7%	54	54	100.0%
	H1903	A24	A*2402 (A*24)	61	60	98.4%	54	54	100.0%
	H1904	A11 A29	A*1101 (A*11) A*2901 (A*29)	61	53	86.9%	52	52	100.0%
	H1905	A24	A*2402 (A*24)	46	46	100.0%	45	45	100.0%
	H1906	A11 A2403	A*1101 (A*11) A*2403 (A*24)	44	41	93.1%	40	37	92.5%
合計および平均				333	319	95.8%	299	296	99.0%

表 5 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	H1901	B48 B77	B*4801 (B*48) B*1513 (B*15)	59	58	98.3%	52	49	94.2%
	H1902	B41	B*4101 (B*41)	58	57	98.3%	51	51	100.0%
	H1903	B48 B77	B*4801 (B*48) B*1513 (B*15)	60	58	96.7%	52	50	96.1%
	H1904	B7 B61	B*0705 (B*07) B*4002 (B*40)	60	60	100.0%	54	53	98.1%
	H1905	B48 B77	B*4801 (B*48) B*1513 (B*15)	44	44	100.0%	44	41	93.1%
	H1906	B75(B15) B55(B56)	B*1502 (*9521) (B*15) (B*95) B*5502 (*5601) (B*55) (B*56)	42	42	100.0%	41	41	100.0%
合計および平均				323	319	98.8%	294	285	96.9%

表 6 Cw 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
Cw	H1901	Cw8	Cw*0801 (Cw*08)	38	37	97.3%	32	32	100.0%
	H1902	(Cw17)	Cw*1701 (Cw*17)	37	34	91.9%	31	31	100.0%
	H1903	Cw8	Cw*0801 (Cw*08)	37	35	94.6%	30	30	100.0%
	H1904	(Cw15)	Cw*1502/13 (Cw*15) Cw*1505	38	38	100.0%	32	31	96.9%
	H1905	Cw8	Cw*0801 (Cw*08)	25	25	100.0%	24	24	100.0%
	H1906	Cw8 (Cw12)	Cw*0801 (Cw*08) Cw*1203 (Cw*12)	24	23	95.8%	22	21	95.5%
合計および平均				199	192	96.5%	171	169	98.8%

表 7 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	H1901	DR12 DR15	DRB1*1202 (DRB1*12) DRB1*1502/19 (DRB1*15)	60	60	100.0%	55	50	90.9%
	H1902	DR11	DRB1*1101 (DRB1*11)	61	59	96.7%	53	53	100.0%
	H1903	DR12 DR15	DRB1*1202 (DRB1*12) DRB1*1502/19 (DRB1*15)	61	60	98.4%	55	51	92.7%
	H1904	DR10 DR11	DRB1*1001 (DRB1*10) DRB1*1106 (DRB1*11)	61	61	100.0%	56	55	98.2%
	H1905	DR12 DR15	DRB1*1202 (DRB1*12) DRB1*1502/19 (DRB1*15)	48	48	100.0%	47	43	91.5%
	H1906	DR14 DR15	DRB1*1405 (DRB1*14) DRB1*1501 (DRB1*15)	47	47	100.0%	45	45	100.0%
合計および平均				338	335	99.1%	311	297	95.5%

して検討を行った。なお、各施設より提出された総合判定にコンセンサスアリル(2桁レベルおよび4桁レベル)と同様の表記が含まれるものを正解とし、正解率を算出した。

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 検査方法別およびローカス別の検査結果報告施設数
- 2.2 検査方法・方法数およびローカス別の検査結果報告施設数
- 2.3 検査方法・方法数および検査ローカス項目の検査結果報告施設数
- 2.4 ローカス別の正解率

3. 結果および考察

3.1 検査方法別およびローカス別の検査結果報告施設数

表1に検査方法別およびローカス別の検査結果報告施設数を示した。データを提出した62施設の内、SSO法を使用している施設が最も多く、次いでSSP法が多く使用されていた。SBT法およびRFLP法を用いている施設数はほぼ昨年度と同様であった。本年度はSSCP法を用いた施設は1施設であった。また、ローカス別ではAローカス61施設、Bローカス61施設、Cローカス40施設、DRB161施設の報告であった。

3.2 検査方法・方法数およびローカス別の検査結果報告施設数

表2に検査方法・方法数およびローカス別の検査結果報告施設数を示した。A, B, CおよびDRB1のいずれにおいても1法のみで検査結果を報告した施設が最も多く、2法の方法を用いた施設では、SSO法とSSP法もしくはSSOとSBT法の組合せで検査を行った施設が多かった。

3.3 検査方法・方法数および検査ローカス項目の検査結果報告施設数

表3に検査方法・方法数および検査ローカス項目の検査結果報告施設数を示した。本QCWSに参加されている施設として検査施設が多く、ルーチン検査で必要とされているローカスの組合せ(あるいは試薬)の選択がなされている傾向があらわれているようである。

3.4 ローカス別の正解率

表4, 表5, 表6および表7にA, B, CおよびDRB1の各ローカス別の正解率を示した。すべてのローカスにおいてほぼ90%以上の正解率を示したが、これまでと同様にA*2901の検出不可によるアサインミスがみられた(H1904)。DRB1においてはDRB1*1502のアサインミスがみられた(H1901(H1903, H1905))。

以上、総合判定において各項目について解析を行ったが、検査方法(試薬)、検査結果の「理解・解釈」および結果表記方法については今後の検討課題であるように思われた。

第11回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門)

—方法論別生データ検討

(いわゆるルミネックス法を除く) PCR-SSO 法—

酒巻建夫(国立病院機構千葉東病院 HLA 検査室), 日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会

1. SSO 法キットと参加施設

PCR-SSO 法を使用した施設は 45 施設あり解答を寄せた 62 施設の 73% であった。SSO 法のうちルミネックス法を除くと 26 施設がエントリーした。その内訳はダイナルリライキットが **19D001, 002, 003, 008, 011, 012, 018, 020, 023, 026, 027, 032, 046, 047, 048, 053, 054, 055, 057, 058, 061, 062** の 22 施設であった。その中で単独使用(太字で表示)は 15 施設, 7 施設は他法との併用であった。ワクナガの MPH2 キットは 19D014, 029, 038, 060 の 4 施設で, 高精度キットまたは他法の併用であった。イノジェネ社のイノリパキットは 19D014 が使用し, 他法との併用であった。SSO 法では多量のテンプレート DNA を必要とする SSP 法に比較し少量のテンプレート DNA で実施できるのでろ紙サンプルや whole genome amplification (WGA) サンプルなどを含め多くの施設が H1901 から H1906 までタイピング結果報告していた。

2. 分析方法

各施設から送られた生データスコアと HLA タイプを比較した。ワクナガキットとイノジェネキットの参加施設が少ない為に解析からは除外した。リライキットでは A 座は従来の 43 プローブキットに加え最新の 48 プローブキットを使用した施設があった。そのままでは比較ができないので 48 プローブの順に 43 プローブスコアを移動した。43 プローブと 48 プローブの対応表は表 1 に示した。報告書のスペースの関係から, すべての生データは参加施設に送付した CD-R に載せ, 今回の報告書には記載を省

表 1 Dynal Reli HLA-A probe 対応

部位aa#	48 Probe kit	43 probe kit
5	1	なし
5	2	1
5	3	2
6	4	3
21	5	なし
54	6	4
59	7	5
60	8	6
58	9	7
59	10	8
59	11	9
62	12	10
67	13	11
67	14	12
71	15	13
70+70	16	14
74	17	15
74	18	16
74	19	17
75	20	18
All Exon 2	21	19
92	22	20
93	23	21
94	24	22
93	25	23
93	26	24
96	27	なし
104	28	なし
141	29	25
149	30	26
147	31	27
149	32	28
174	33	29
153	34	30
154	35	31
152	36	32
160	37	33
161	38	34
161	39	35
159	40	36
159	41	37
164	42	38
164	43	39
162	44	40
60+79	45	41
161+168	46	なし
Intensity control probe	47	42
Assay control probe	48	43

略した。

3. スコアー化生データの相違

HLA-A, B, DRB, DQB アリルのタイピングにおいて、特異的プローブとの反応スコアーは陽性(スコアー 4-8)と陰性(1-2)ではおおむね一致していた。しかし施設間でもっともスコアーにバラツキがみられたのは内部に設定してある基準プローブのスコアーであった。スコアー 1 から 8 まで大きな開きがあった。本キットでは基準コントロールプローブの発色強度がスコアー 4 程度に設定され、その基準よりも濃いものを陽性と判定するように調整されている。特異的プローブも内部コントロールプローブもロットにより若干強度が異なることがあるが、この原因としてはプローブの配列そのものを変更していないとすればメーカー側の原因としてストリップに結合してあるプローブの多少による影響がある。今回の参加施設においてはいくつかの施設で同一のロットを使用しているためロット間の差異を考慮せずに施設間の差異を比較することが可能であった。施設によりプローブの発色とバックグラウンドから絶対的なスコアー化の基準はないと考えられるが、同一ロットでも基準プローブがきわめて強く発色する場合と逆にほとんど発色がみられない場合などから検査を実施する側に原因があると考えられる。PCR 産物量、発色時の温度設定や反応時間、振とうの有無、使用している洗浄液そのものなどが異なると発色程度にバラツキが起こる。内部コントロールプローブの発色が濃く出たり薄く出たりしている施設ではプロトコール通り行われているか再度チェックする必要がある。

4. アサインについて

発色プローブからタイプを出すに当たりほとんどの施設ではコンピュータ解析プログラムを使用していると考えられる。HLA 型(血清対応型)に読み替えることについてはほぼ間違えることなく行われていた。プローブとの反応が同じでも DNA (型) が異なっていた。DNA 型の表記法では本学会の標準化委員会での提唱に即した方法による記載が行われていない例が多く認められた。さらに HLA クラス II ア

リルについて日本人に認められる連鎖不平衡によるアリルのみ考慮に入れたタイプを選択するなど誤る例が認められた。

5. HLA-A 座について

A 座では 22 施設が解答を寄せた。48 プローブキット、43 プローブキットともに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。H1901, 1903, 1905 検体は同一検体であった。19D055 と 19D061 施設では 48 プローブキットで 4 番目に対する反応が擬陽性となっていたが、本来このプローブはスコアー 8 で強く反応するので、過剰に判定したと考えられた。多くの施設がこのプローブの反応について陰性の場合にもスコアー 2 としているので、交差性があるプローブと考えられる。H1906 検体については 19D062 では多数の偽陰性や擬陽性のプローブ反応が見られたが、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。43 番目のプローブを陽性と判定した施設 (19D020, 047, 048) が A*2403 とアサインしたりしているが、このプローブが陽性ならば A*2402 と判定すべきであろう。44 番目のプローブを陰性と判定した 1 施設 (19D054) は 42 番目のプローブも陰性として A*1115 とアサインしているが 42 番目を陽性として A*1104 も含めてアサインすべきだろう。

6. HLA-B 座について

B 座には 22 施設が解答を寄せ、全施設が 62 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。19D020 の施設では H1901, 1903, 1905 検体で B*1513 ではなく B*1502/88 とアサインしていた。原因は 27 番目のプローブを陰性と誤って判定したため、他に同じロットを使用した施設が 2 つあり、ともに陽性と判定している。日本人では希なタイプが出たために陰性と判定したと考えられる。19D055 施設では 31 番目のプローブを陽性、32 番目プローブを陰性としているがタイプは B*4803 ではなく B*4801 としているので、スコアーの記載ミスと思

われる。同様に 19D054 施設ではスコア 18 と記入していたが結果報告するときに見直しをしていないのではないかと推測された。

7. HLA-C 座について

D-003, 012, 020, 027, 046, 047 の 6 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昨年同様に 37 プローブで判定するようになっていた。生データは各施設ともほぼ一致していた。H1906 の検体にたいし 19D012 の施設では 1 プローブの擬陰性があり 1 アリルの特異性が抜けていた。

8. HLA-DRB について

DRB 座については 22 施設が参加し、全例プローブ数 54 のキットを使用していた。相変わらず DRB1 のアリ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。DRB3-5 アリルについてはマニュアル判定になるためと考えられる。DRB1-DRB3, 4, 5-DQB1 連鎖から正確なタイピングが可能となるのでは非、常にアサインするように心がけるべきだろう。DRB1 遺伝子に加え、DRB3 や DRB5 遺伝子が増幅されるような例ではアサインアリルの組み合わせが増加し判定が難しくなる。

リライの判定プログラムでは 86 番目のアミノ酸がクリシンかバリンによるグループとして可能性のアリルを表示しているが、キット使用では実際に区別できる例は少ない。H1901, 1903, 1905 検体では DRB5 遺伝子が 0101 アリルになるので日本人ではほとんど例外なく DRB1*1501 になるために、QCWS の H1901 検体についても日本人の連鎖を考えて DRB1*1501 グループのみを正解として記載した施設が多く認められた。実際には DRB1*1502 が正解で、連鎖として DRB5*0101 と DQB1*0502 になっていた。86 番目のコドンが区別できないもので DRB1*1501/02/04/+ と表記すべきであろう。DR15,

DR16 関連では日本人に強く見られる連鎖はむしろ例外的で世界的にはこのような組み合わせが多数存在する。この検体では B77 抗原が見られることから日本人由来の検体ではないと気がつけば正解率も向上すると思われる。H1903, H1905 の検体について生データ上は H1901 と遜色なく反応していた。

H1902 検体と H1904 についてはほぼ問題なくアサインされていた。

H1906 の検体は H1701 と同一の検体であり、2 年前には DRB1*1405 と 1501 の特異性が決定できたが、最新のアリルの登録からリライキットではジェネリック増幅プライマーでは DRB1*1152 と DRB1*1405 が区別できない。このケースでは DR3, 11, 13, 14 用のプライマーを使用しても区別はできない。ただしこの検体では 1 アリルのみが増幅されるので 86 番目のグリシンとバリンの判定が行われる。リライのキットでは 16 番目のアミノ酸に対するプローブが入れてないために DRB1*1405 の区別がつかない。しかしながら多くの施設では DRB1*1405 を採用したのは希なタイプではなく頻度が高く確率的に可能性のあるアリルを選択したと考えられる。今後も個人レベルの SNP を新抗原として認定されるようになると 2 桁レベルの区別ができないようなことが頻発すると考えられる。

9. HLA-DQB1 について

DQB1 座に対しては 19D003, 012 の 2 施設が参加した。プローブの反応は一部で不一致が認められた。

10. リライキットのまとめ

生データを比較すると各施設間のバラツキも少なく、良好な反応を示していた。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、十分に対応していた。HLA 型(血清型)への読替には問題がないが、最終的なアリルの記載ではルールを守らない施設間が多く、課題が残った。

第11回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —生データ解析：いわゆる“Luminex 法”—

丸屋悦子(特定非営利活動法人HLA 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

1. はじめに

第11回 QCW は昨年度に比べ Luminex 法を使用した施設の減少(10% 減)が見られ, 使用されたキット(今年は●・■・▲で表記する)は昨年と同じメーカーで, 使用 Lab 数はメーカーにより減少がみられた(表1)。今年度は各施設別, キット別の解析評価のレベルアップをおこない, キット別・タイピング座位別の検定可能プローブの評価をおこなった。参加施設の多い HLA-A, C, B, DR について報告する。

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 (CSV file) から蛍光値を用い解析し, 総合的な評価を試みた。

2. 配布 DNA 6 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4種の細胞由来

(H1901 = H1903 = H1905, H1902, H1906)である。H1901, H1903, H1905 については同一細胞由来で, 細胞から分離した DNA, ろ紙に付着させたもの, WGA (whole genome amplification) により増幅した DNA であった。同一細胞から異なった方法でえられたテンプレートがタイピングに及ぼす影響の有無を検証する目的で配布された。参加施設のタイピング結果を使用 kit 別に分類し座位別に比較した(表2-5)。

HLA-A 座

1 施設で検体の取り違いと思われる記載があった。その他については表記法や細部の判定結果などにバラツキはみられたものの大きな問題点はなかった。同一細胞由来の3検体についても A 座タイピング結果は施設ごとに完全に一致(1 施設のみフィルターで検査不能)していた。

HLA-B 座

同一細胞由来の3検体について, 1 施設の判定が他施設と一致しなかった (HLA-B77 vs B75)。その原因は日本人にまれな抗原型またはアリル型の場合,

表1 使用キット別参加施設一覧

施設名	1 D004	2 D005	3 D006	4 D009	5 D010	6 D015	7 D017	8 D021	9 D025	10 D028	11 D030	12 D034	13 D036	14 D037	15 D041	16 D049	17 D056	18 D059	Total
●	○										○	○		○	○	○			6
■	○	○	○			○	○	○				○		○				○	9
▲				○	○				○	○	○		○					○	7



CSV fileの提出が無かった。

表 2 HLA-A 座判定結果一覧

HLA-A locus		H1901		H1902		H1903		H1904		H1905		H1906	
使用キット	#	Lot	施設コード	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型
●	1	F003A	19D004	A*2402+	-	A*0101+	-	A*2402+	-	A*1101+	-	A*2403+	A*1101+
	2	F003A	19D030	A*2402/03/05+	-	A*0101/02/03+	A*0136	A*2402/03/05+	-	A*1101/03/06+	-	A*2403/22/23+	A*1101/03/04+
	3	F003A	19D034	A*2402/03+	-	A*0101/02+	-	A*2402/03+	-	A*1101/03	-	A*2403/10+	A*1101/03+
	4	F003A	19D049	A*2402/03/05+	-	A*0101/3604+	-	A*2402/03/05+	-	A*1101/03/06+	-	A*2403/10/22+	A*1101/03/04+
	5	F004A	19D037	A*2402/05/09+	-	A*0101/02/04+	-	A*2402/05/09+	-	A*1101/03/07+	-	A*2403/22/23+	A*1101/03/05+
	6	F004A	19D041	A*2402/09/11+	-	A*0101/04/08+	-	A*2402/09/11+	-	A*1101/03/06+	-	A*2403/10/22+	A*1101/03/04+
■	1	8	D005	A*2402/05/09N+	-	A*0101/01N/04N+	-	A*2402/05/09N+	-	A*1101/01N/02+	-	-	A*2402/05/09N+
	2	8	D015	A*2402/05/09N+	A*2402/09N/11N+	A*0101/01N/02+	A*0101/01N/04N+	A*2402/05/09N+	A*2402/09N/11N+	A*1101/02/03+	A*2402/09N/11N+	A*2403/10/22+	A*1101/02/03+
	3	8	D021	A*2402/05/09N+	-	A*0101/01N/02+	-	A*2402/05/09N+	-	A*1101/02/03+	-	A*2403/10/22+	A*1101/02/03+
	4	8	D056	A*2402/09/11+	A*2402/05/09+	A*0101/04/09+	A*0101/04/09+	A*2402/09/11+	A*2402/05/09+	A*1101/02/03+	-	-	-
▲	5	3JPN	D006	A*2402/05/09+	-	A*0101/02/04+	-	A*2402/05/09+	-	A*1101/03/07+	-	A*2410	A*1101/03/07+
	6	3JPN	D037	A*2402/05/09+	-	A*0101/02/04+	-	A*2402/05/09+	-	A*1101/03/07+	-	A*2403/22/23+	A*1101/03/05+
	1	003	19D009	A*24	-	A*01	-	A*24	-	A*11	-	A*24	A*11
	2	003	19D025	A*2402/05/09N+	-	A*0101/03/04N+	-	A*2402/05/09N+	-	A*1101/03/05+	-	A*2403/10/22+	A*1101/03/04+
	3	003	19D030	A*2402/05/07+	-	A*0101/03/04N+	-	A*2402/05/07+	-	A*1101/03/05+	-	A*2403/22/23+	A*1101/03/04+
	4	002	19D010	A*2402/05/07+	-	A*0101/03/04+	-	A*2402/05/07+	-	A*1101/03/05+	-	A*2403/10/22+	A*1101/03/04+
	5	002	19D028	A*2402/05/07+	-	A*0101/03/04N+	-	A*2402/05/07+	-	A*1101/03/05+	-	A*2403/22/23+	A*1101/03/05+
	6	002	19D036	A*2402/05/09N+	-	A*0101/03/04N+	-	A*2402/05/09N+	-	A*1101/03/05+	-	A*2403/10/22+	A*1101/03/04+
	7	001	19D059	A*2402/05/07+	-	A*0101/09/09+	-	A*2402/05/07+	-	A*1101/03/05+	-	A*2403/10/22+	A*1101/03/04+

表 3 HLA-B 座判定結果一覧

HLA-B locus		H1901		H1902		H1903		H1904		H1905		H1906			
使用キット	#	Lot	施設コード	H1901		H1902		H1903		H1904		H1905		H1906	
				DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型		
●	1	F003B	19D004	B*1513	B*4801/04/09/11	-	B*4101/05/06/+	B*1513	B*4801/04/09/11	B*0705/+	B*4002/+	B*1513	B*4801/04/09/11	B*1502/88	B*5502/16/19
	2	F003B	19D030	B*1513	B*4801/04/09/+	-	B*4101/05/06/+	B*1513	B*4801/04/09/+	B*0705/06/40	B*4002/27/35/+	B*1513	B*4801/04/09/+	B*1502	B*5502
	3	F003B	19D034	B*1502/88	B*4801/04/+	-	B*4101/05/+	B*1502/88	B*4801/04/+	B*0705/06/+	B*4002/27/+	B*1502/88	B*4801/04/+	B*1502/88	B*5502/16/+
	4	F003B	19D037	B*1513	B*4801/09/11	-	B*4101/05/06/+	B*1513	B*4801/09/11	B*0705/06/17	B*4002/09/27/+	B*1513	B*4801/09/11	B*1502	B*5502/12/16/+
	5	F003B	19D049	B*1513	B*4801/04/09/+	-	B*4101/05/06/+	B*1513	B*4801/04/09/+	B*0705/06/40	B*4002/27/35/+	B*1513	B*4801/04/09/+	B*1502/88	B*5502/16/19
	6	F004B	19D041	B*1513	B*4801/04/09/+	-	B*4101/05/06/+	B*1513	B*4801/04/09/+	B*0705/06/40	B*4002/27/40/+	B*1513	B*4801/04/09/+	B*1502/9521	B*5502/5601/+
■	1	11	D005	B*1513	B*4801/09/11	-	B*4101/05/07	B*1513	B*4801/09/11	B*0705/06/17	B*4002/04/09/+	増幅不良		B*1502/9512	B*5502/12/16/+
	2	11	D015	B*1513	B*4801/09/11	B*4101/06/07	B*4101/05/06/+	B*1513	B*4801/09/11	B*0705/06/17	B*4002/04/09/+	B*1513	B*4801/09/11	B*1502/9512	B*5502/12/16/+
	3	11	D021	B*1513	B*4801/09/11	-	B*4101/05/06/+	B*1513	B*4801/09/11	B*0705/06/17	B*4002/04/09/+	B*1513	B*4801/09/11	B*1502/9512	B*5502/12/16/+
	4	11	D056	B*1513	B*4801/09/11	B*4101/06/07	B*4101/05/06/+	B*1513	B*4801/09/11	B*0705/06/17	B*4002/04/09/+				
▲	5	3JPN	D006	B*1513	B*4801/09/11	-	B*4101/05/06/+	B*1513	B*4801/09/11	B*0705/06/17	B*4002/09/27/+	B*1513	B*4801/09/11	B*1502	B*5502/12/16/+
	6	3JPN	D037	B*1513	B*4801/09/11	-	B*4101/05/06/+	B*1513	B*4801/09/11	B*0705/06/17	B*4002/09/27/+	B*1513	B*4801/09/11	B*1502	B*5502/12/16/+
	1	001	19D059	B*1513	B*4801/09	-	B*4101/05/06	B*1513	B*4801/09	B*0705/06/28	B*4002/09/27/+	B*1513	B*4801/09	B*1502/88	B*5501/02/05/+
	2	002	19D010	B*1513	B*4801/09	-	B*4101/05/06	B*1513	B*4801/09	B*0705/06/28	B*4002/09/27/+	B*1513	B*4801/09	B*1502/88	B*5501/02/05/+
	3	002	19D028	B*1513	B*4801/09	B*4101/05/06	-	B*1513	B*4801/09	B*0705/06/28	B*4002/09/27/+	B*1513	B*4801/09	B*1502/88	5501/02/05/+
	4	003	19D009	B*1513	B*4801/09	B*4101/05/06	B*4101/05/06	B*1513	B*4801/09	B*07	B*40	B*1513	B*4801/09	B*15	B*55
	5	003	19D025	B*1513	B*4801/09	-	B*4101/05/06	B*1513	B*4801/09	B*0705/06/28	B*4002/09/27/+	B*1513	B*4801/09	B*1502/88	B*5501/02/05/+
	6	003	19D030	B*1513	B*4801/09	-	B*4101/05/06	B*1513	B*4801/09	B*0705/06/28	B*4002/09/27/+	B*1513	B*4801/09	B*1502/88	B*5501/02/05/+
	7	003	19D036	B*1513	B*4801/09	-	B*4101/05/06	B*1513	B*4801/09	B*0705/06/28	B*4002/09/27/+	B*1513	B*4801/09	B*1502/88	B*5501/02/05/+

表 4 HLA-C 座判定結果一覧

HLA-C locus		H1901		H1902		H1903		H1904		H1905		H1906	
使用キット	#	Lot	施設コード	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型
●	1	F003C	19D034	Cw*0801/04+	-	Cw*1701/02/03+	-	Cw*1502/05	Cw*1505/13	Cw*0801/04+	-	Cw*0804	Cw*1203
	2	F003C	19D037	Cw*0801/04/08/+	-	Cw*1701/02/03/+	-	Cw*1505	Cw*1502/13	Cw*0801/04/08/+	-	Cw*0801/08	Cw*1203/06/12/+
	3	F003C	19D041	Cw*0801/04/08/+	-	Cw*1701/02/03/+	-	Cw*1502/13	Cw*1505	Cw*0801/04/08/+	-	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+
	4	F003C	19D049	Cw*0801/04/08/+	-	Cw*1701/02/03/+	-	Cw*1502/05/13	-	Cw*0801/04/08/+	-	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+
■	1	6	D006	Cw*0801/08	-	Cw*1701/02/03	-	Cw*1502/03/05/+	-	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+
	2	6	D021	Cw*0801/08	-	Cw*1701/02/03/+	-	Cw*1502/03/05/+	-	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+
	3	7	D005	Cw*0801/08	-	Cw*1701/02/03/+	-	Cw*1502/03/05/+	-	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+
	4	7	D015	Cw*0801/08	-	Cw*1701/02/03/+	-	Cw*1502/05/06/+	Cw*1502/03/05/+	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+
▲	1	001	19D036	Cw*0801/08	-	Cw*1701/02/03	-	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+
	2	002	19D025	Cw*0801/08	-	Cw*1701/02/03	-	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+
	3	002	19D028	Cw*0801/08	-	Cw*1701/02/03	-	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+
	4	002	19D030	Cw*0801/08	-	Cw*1701/02/03	-	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	-	Cw*0801/08	Cw*1203/06/07/+
	5	003	19D009	Cw*0801/08	Cw*0801/08	Cw*1701/02/03	Cw*0801/08	Cw*0801/08	Cw*0801/08	Cw*0801/08	Cw*0801/08	Cw*08	Cw*12

表 5 HLA-DR 座判定結果一覧

HLA-DR locus		H1901		H1902		H1903		H1904		H1905		H1906	
使用キット	#	Lot	施設コード	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型	DNA型
●	1	F003D	19D004	DRB1*1502/11/14	DRB1*101/05/08/+	-	DRB1*1502/11/14	DRB1**202	DRB1**1001	DRB1**1502/11/14	DRB1**1202	DRB1**1405/43/45	DRB1**1501/03/06/+
	2	F003D	19D030	DRB1*1502/11/14	DRB1**101/05/08/+	DRB1**11/13	DRB1**1202	DRB1**1502/11/14	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/11/14	DRB1**1405/43/45	DRB1**1501/03/06/+
	3	F003D	19D034	DRB1*1502/11/+	DRB1**101/05/+	-	DRB1**1202	DRB1**1502/11/+	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/11/+	DRB1**1405/43/+	DRB1**1501/03/+
	4	F003D	19D037	DRB1*1502/08/14	DRB1**101/05/12/+	-	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14	DRB1**1405/45	DRB1**1501/13/16
	5	F003D	19D049	DRB1*1502/11/14	DRB1**101/1307/+	-	DRB1**1202	DRB1**1502/11/14	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/11/14	DRB1**1405/43/45	DRB1**1501/03/06/+
	6	F004	19D041	DRB1*1502/14/19	DRB1**101/1346/+	-	DRB1**1202/13	DRB1**1502/14/19	DRB1**1001	DRB1**1202/13	DRB1**1502/14/19	DRB1**1405/43	DRB1**1501/03/06/+
■	1	11	D005	DRB1*1502/08/14	DRB1**101/05/12/+	-	DRB1**1202/13	DRB1**1502/08/14	DRB1**1001	DRB1**1202/13	DRB1**1502/08/14	DRB1**1405/45	DRB1**1501/13/16/+
	2	11	D015	DRB1*1502/08/14	DRB1**101/12/15/+	DRB1**101/05/12/24/+	DRB1**1202/13	DRB1**1502/08/14	DRB1**1001	DRB1**1202/13	DRB1**1502/08/14	DRB1**1405/45	DRB1**1501/13/16
	3	11	D021	DRB1*1502/08/14	DRB1**101/05/12/+	-	DRB1**1202/13	DRB1**1502/08/14	DRB1**1001	DRB1**1202/13	DRB1**1502/08/14	DRB1**1405/45	DRB1**1501/13/16/+
	4	11	D056	DRB1*1502/08/14	DRB1**101/12/15/+	DRB1**101/05/12/24/+	DRB1**1202/13	DRB1**1502/08/14	DRB1**1001	DRB1**1202/13	DRB1**1502/08/14	DRB1**1405/45	DRB1**1501/13/16/+
	5	5JPN	D004						DRB1**1001	DRB1**1502/11/14	DRB1**1202		
	6	5JPN	D006	DRB1*1502/08/14	DRB1**101/05/12/+	-	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14	DRB1**1405/45	DRB1**1501/13/16
▲	7	5JPN	D037	DRB1*1502/08/14	DRB1**101/05/12/+	-	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14	DRB1**1405/45	DRB1**1501/13/16
	1	001	19D025	DRB1*1502/08/14/+	DRB1**101/05/11/+	-DRB1*0309/17/+	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1405/45	DRB1**1501/03/06/+
	2	001	19D028	DRB1*1502/08/14/+	DRB1**101/05/11/+	-	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1405/45	DRB1**1501/03/06/+
	3	001	19D036	DRB1*1502/08/14/+	DRB1**101/05/11/+	-DRB1*0309/17/+	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1405/45	DRB1**1501/03/06/+
	4	001	19D059	DRB1*1502/08/14/+	DRB1**101/05/11/+	-DRB1*0309/17/+	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1405/45	DRB1**1501/03/06/+
	5	003	19D009	DRB1*1502/08/14/+	DRB1**11	-	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1405/45	DRB1**1501/03/06/+
	6	003	19D030	DRB1*1502/08/14/+	DRB1**03/11	DRB1**11/13/15	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1405/45	DRB1**1501/03/06/+
	7	200	19D010	DRB1*1502/08/14/+	DRB1**101/05/11/+	-	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1001	DRB1**1202	DRB1**1502/08/14/+	DRB1**1405/45	DRB1**1501/03/06/+

表 6 1probe の反応性の違いにより生じた抗原型不一致 ; HLA-B 座

HLA-B座の問題点: probe B2~27の反応性				probe B2~27の蛍光値		
施設ID	lot No	allele結果		H1901	H1903	H1905
19D004	F003B	B*1513	B*4801/04/09/11	1435	686	890
19D030	F003B	B*1513	B*4801/04/09/+	856	582	434
19D034	F003B	B*1502/88	B*4801/04/+	394	469	435
19D037	F003B	B*1513	B*4801/09/11	1105	625	670
19D049	F003B	B*1513	B*4801/04/09/+	967	523	781
19D041	F004B	B*1513	B*4801/04/09/+	997	1000	775

タイピングキット●使用施設における1施設のアリル型判定不一致例である。日本人用のKitでまれな抗原型の判定であり、

抗原を区別するprobeが1probeの場合の悲劇である。

Cut off 周辺の反応性の違いによりHLA-B77がHLA-B75と判定された。

1probe のみが判定のキーになる場合があり、その probe の反応性が弱いすなわち P/N 比が低い結果、cut off 値を僅かに下回る蛍光値を陰性と判断したためであった(表6)。同一細胞由来の3検体についてB座タイピング結果は施設ごとに完全に一致(1施設のみフィルターで検査不能)していた。

HLA-C and DR 座

特記する問題点はなかった。また同一細胞由来の3検体についてC, DR座タイピング結果は施設ごとに完全に一致(1施設のみフィルターで検査不能)していた。

3. 施設別総合評価

表7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 con-

trol 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。

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

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

$$\text{Rex3} = (\text{exon3 sense PC} / \text{exon 3 anti-sense PC})$$

R, Rex2, Rex3 の値が 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7のPCR精度*の欄に示す得点は Rex2 と Rex3 を用いて計算した場合の得点である。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(●キットのコントロールがこれに該当する)。

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, $0.5 \geq 1$ 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

表7 施設別総合評価(第11回 QCW DNA 部門)

施設ID	A		B		Cw		Class I		DRB1		DOB1		DPB1		Class II		評価
	Kit	P/N 比	PCR 精度*	P/N 比	PCR 精度*	P/N 比	PCR 精度*	P/N 比	P/N 比	PCR 精度*	P/N 比	PCR 精度*	P/N 比	PCR 精度*	P/N 比	PCR 精度*	
D049	●	4.1	3.7	3.8	3.3	5.0	4.0	4.1	3.7	2.5	3.8	4.1	3.4	7.9	7.2		
	●	3.4	4.0	4.0	3.3	4.0	3.5	3.7	3.3	2.8	3.5	3.8	3.4				
D037	■	3.4	4.3		3.1	3.7					3.2	4.0					
	総合										3.4	3.9	3.7				
D041	●	4.2	3.7	4.3	4.0	3.7	3.0	4.0	2.3	3.8	4.0	3.2	3.7	7.2	7.7		
D006	■	4.0	3.3		3.9	4.3		3.5	2.7		3.8	3.4		7.2			
D021	■	3.4	3.0		3.7	4.3		3.2	3.3		3.4	3.6		7.0			
D015	■	3.2	3.0		3.4	4.0		3.2	3.3		3.3	3.4		6.7			
D034	●	3.3	3.0	3.5	3.0	3.7	4.3	4.0	3.0	4.2	3.4	3.2	4.0	6.6	7.4		
D056	■	3.4	4.0		3.5	2.0					3.4	3.0		6.4			
D004	●	3.1	1.7	3.2	3.0	5.0	2.7				3.1	3.3	2.9	6.4	6.0		
	●	4.2	3.3	3.7	3.5	3.0	4.0				3.9	3.2	3.8				
D030	▲	3.6	1.0		3.4	2.7		3.6	2.7		3.5	2.1		6.3	6.7		
	総合										3.7	2.6	3.0				
D005	■	3.7	3.7		2.5	2.0		3.0	2.7		3.1	2.8		5.9			
D028	▲	4.2	1.0		3.9	2.3		3.6	2.3		3.9	1.9		5.8			
D010	▲	3.5	1.3		3.5	2.3					3.5	1.8		5.3			
D036	▲	3.7	1.0		3.5	1.3		3.7	2.3		3.6	1.6		5.2			
D009	▲	3.4	1.0		3.2	1.7		3.5	2.7		3.4	1.8		5.1			
D025	▲	3.6	1.0		3.1	1.0		3.4	2.0		3.4	1.3		4.7			
D059	▲	3.0	1.0		3.2	2.0					3.1	1.5		4.6			

評価法

PCR精度: HLA-class Iの場合exon 2, 3のPCR産物をタイピングに用いる。Probeの反応部位は両領域に存在し、

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exonのsense側、

anti-sense側共にバランスよく増幅されることが重要である。PCRの精度の評価としてexon2/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点とし、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。

PCR精度: Sense, anti-senseに対するコントロールがあるキットでは各exonのsenseとanti-senseの比による得点から

上記と同様の方法で施設得点を計算した。TotalはPCR精度*P/N比による総合評価を示している。

HLA-class IIはexon2の増幅産物を使用するため、同一キット使用施設の陽性コントロール量の平均値との比で評価した。

P/N: Hybridization法の評価のため、施設ごとに使用キットの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となる。(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) 100 =5点、100-50 =4点、50-10 =3点、10-3 =2点、3< > =1点

とした。施設ごとに評価できるprobeのP/Nの得点を加算し、平均値を施設得点とした。

施設ID	DRB1		DOB1		DPB1		Class II		評価	
	P/N 比	PCR 精度	P/N 比	PCR 精度	P/N 比	PCR 精度	P/N比	PCR 精度		
D034	Kit	4.5	5.0					4.5	5.0	total
	●							4.3	4.7	
	■			4.3	5.0	4.2	4.3	4.4	4.8	
総合										
D006	■	4.2	4.7	4.2	5.0	4.5	5.0	4.3	4.9	9.2
D049	●	4.2	5.0					4.2	5.0	9.2
D030	●	4.4	5.0					4.4	5.0	9.1
	▲	3.7	5.0					3.7	5.0	
	総合							4.1	5.0	
D010	▲	3.9	5.0					3.9	5.0	8.9
D005	■	3.8	5.0			4.2	4.0	4.0	4.5	8.5
D021	■	3.4	4.7	3.8	5.0			3.6	4.8	8.4
D041	●	4.3	4.0					4.3	4.0	8.3
D009	▲	3.3	4.7					3.3	4.7	8.0
D004	●	4.0	4.7					4.0	4.7	7.7
	■	3.7	3.0					3.7	3.0	
	総合							3.8	3.8	
D059	▲	3.1	4.7					3.1	4.7	7.7
D037	●	3.1	4.7					3.1	4.7	7.5
	■	3.0	4.3					3.0	4.3	
	総合							3.0	4.5	
D028	▲	3.2	4.0					3.2	4.0	7.2

施設ID	DRB1		DOB1		DPB1		Class II	評価		
	P/N 比	PCR 精度	P/N 比	PCR 精度	P/N 比	PCR 精度				
D034	Kit	4.5	5.0					4.5	5.0	9.2
	●							4.3	4.7	
	■			4.3	5.0	4.2	4.3	4.4	4.8	
総合										
D006	■	4.2	4.7	4.2	5.0	4.5	5.0	4.3	4.9	9.2
D049	●	4.2	5.0					4.2	5.0	9.2
D030	●	4.4	5.0					4.4	5.0	9.1
	▲	3.7	5.0					3.7	5.0	
	総合							4.1	5.0	
D010	▲	3.9	5.0					3.9	5.0	8.9
D005	■	3.8	5.0			4.2	4.0	4.0	4.5	8.5
D021	■	3.4	4.7	3.8	5.0			3.6	4.8	8.4
D041	●	4.3	4.0					4.3	4.0	8.3
D009	▲	3.3	4.7					3.3	4.7	8.0
D004	●	4.0	4.7					4.0	4.7	7.7
	■	3.7	3.0					3.7	3.0	
	総合							3.8	3.8	
D059	▲	3.1	4.7					3.1	4.7	7.7
D037	●	3.1	4.7					3.1	4.7	7.5
	■	3.0	4.3					3.0	4.3	
	総合							3.0	4.5	
D028	▲	3.2	4.0					3.2	4.0	7.2

メリハリぐわいを評価するため、昨年同様 P/N 比を求め、昨年度よりも厳しい(より詳しい)評価点を与えた。すなわち $P/N > 100 = 5$ 点, $100-50 = 4$ 点, $50-10 = 3$ 点, $10-3 = 2$ 点, $3 > = 1$ 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。

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

HLA-class I typing では D041, D034, D049 が優秀な成績で、70 点以上の施設は 5 施設(29%)であった。一方、60 点に満たない施設が 7 施設(41%)あった。これらの施設についてはタイピングをおこなう環境の見直し(PCR や Hybridization 温度の再調整など)と整備が必要と考えられる。

HLA-class II typing では D006, D034, D006, D030 が優秀な成績で、70 点以上の施設は 14 施設(82%)と良好であった。

今年度の HLA-class I・II の総合評価で最優秀施設は D049 で 86 点、80 点以上の施設は D006, D034, D041 であった。各施設が最低 60 点は確保できることが望ましい。

4. キット別総合評価

表 8 にキット別総合評価を図 1~4 に今回の検体で検定された probe の P/N 比の分布を示す。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：●キットが最高得点(65 点)で、■キットの 62 点と続くが、残念なことに▲キットは 34 点と低得点で、特に PCR 精度についての得点数が低かった。▲メーカーにはプライマーの設計や PCR 条件について多くの施設が良い条件で

使用可能なキットの開発が望まれる。

➤ HLA-B typing キット：●キットが最高得点(64 点)であり、■キットが 56 点、▲キット 45 点であった。HLA-A typing キットと同様の結果で、▲メーカーには HLA-A typing キットへのコメントと同様。

➤ HLA-C typing キット：●キットが最高得点(64 点)、▲キットが 54 点、■キットが 52 点であり、HLA-C typing キットについてはメーカーごとに大差はなかった。

HLA-class I キット全体で最高得点は●キットであり、複数の施設が使用しても施設間差がでにくい良好なキットと思われる。今後さらに安定した精度の高いキットの製造にむけて、切磋琢磨を 3 社にお願いしたい。

➤ HLA-DRB1 typing キット：●キットが最高得点の 78 点であった。次に■キットの 70 点、▲キットの 65 点であった。HLA-class I 同様●キットが複数施設使用でも最高の得点を示し、現時点で一番信頼性の高いキットと評価される。

HLA-class I と class II ともに●キットが今回の QC では最良のキットと評価された。各キットの評価可能プローブの P/N 比の分布グラフ(図 1~4)から、キット別にプローブの P/N 比の分布状況が一覧できる。最高得点を得たキットは全体的に使用プローブの P/N 比が右より(高い P/N 比のプローブの数が多)の分布を示している。

5. まとめ

昨年の QC の評価基準より、キットに使用されているプローブの P/N 比の評価を厳しくおこなった。結果として施設間差やキット差が明確になった。全参加施設が 60 点を超えるような検査環境の整備が望まれる。

年 1 回、数種類の検体によるタイピング結果の一致率での評価は精度管理としては不十分であるが、Luminex 法による PCR 精度や P/N 比による評価をおこなうことにより各施設の検査環境の検定にもなり有用と考える。

表 8 kit 別総合評価(第 11 回 QCW DNA 部門)

kit		A			B			Cw			Class I			評価	
		P/N比	PCR 精度	PCR 精度*	P/N比	PCR 精度	PCR 精度*	P/N比	PCR 精度	PCR 精度*	P/N比	PCR 精度	PCR 精度*	total	total*
●	Total	2.7	3.2	3.8	2.8	4.1	3.6	3.1	3.1	3.3	2.9	3.5	3.6	6.3	6.4
	filter	3.0	3.7	3.5	2.6	3.0	3.6	2.5	2.0	3.0	2.7	2.9	3.4	5.6	6.1
	DNA	2.8	3.0	3.9	3.0	4.6	3.6	3.7	3.6	3.5	3.1	3.7	3.7	6.9	6.8
■	total	2.6	3.6		2.2	3.4		2.2	3.0		2.4	3.3		5.7	
	filter	2.5	3.2		2.7	3.2		3.0	2.3		2.7	2.9		5.6	
	DNA	3.1	3.7		2.5	3.6		2.8	3.4		2.8	3.5		6.3	
	DNA*	3.3	3.6		2.5	3.9					2.9	3.8		6.7	
▲	total	2.4	1.0		2.6	1.9		3.0	2.4		2.7	1.8		4.5	
	filter	2.7	1.0		2.9	2.0		2.7	1.4		2.7	1.5		4.2	
	DNA	2.5	1.1		2.9	1.9		3.1	2.9		2.9	1.9		4.8	

kit		DRB1		DQB1		DPB1		Class II		評価
		P/N比	PCR 精度	P/N比	PCR 精度	P/N比	PCR 精度	P/N比	PCR 精度	
●	total	3.1	4.7					3.1	4.7	7.8
	filter	3.2	4.5					3.2	4.5	7.7
	DNA	3.4	4.8					3.4	4.8	8.3
■	total	2.2	4.0	2.0	4.6	3.6	4.4	2.6	4.4	7.0
	filter	2.1	4.3	2.3	4.3	4.0	4.3	2.8	4.3	7.1
	DNA	2.7	4.0	3.4	4.8	4.2	4.5	3.4	4.4	7.8
	DNA*	2.9	4.2					2.9	4.2	7.1
▲	total	2.2	4.3					2.2	4.3	6.5
	filter	2.6	4.0					2.6	4.0	6.6
	DNA	2.7	4.4					2.7	4.4	7.1

kit		総合評価	
●	total	14.1	14.2
	filter	13.3	13.8
	DNA	15.1	15.1
■	total	12.7	
	filter	12.7	
	DNA	14.2	
	DNA*	13.7	
▲	total	11.0	
	filter	10.8	
	DNA	11.9	

評価法

PCR精度: HLA-class Iの場合exon 2、3のPCR産物をタイピングに用いる。Probeの反応部位は両領域に存在し、

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exonのsense側、anti-sense側共にバランスよく増幅されることが重要である。PCRの精度の評価として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点とした。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。

PCR精度*: Sense、anti-senseに対するコントロールがあるキットでは各exonのsenseとanti-senseの比による得点から

上記と同様の方法で施設得点を計算した。Total*はPCR精度*とP/N比による総合評価を示した。

HLA-class IIはexon2の増幅産物を使用するため、同一キット使用施設の陽性コントロール値の平均値との比で評価した。

P/N: Hybridization法の評価のため、施設ごとに使用Kitプローブの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となる。(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>100 =5点、100-50 =4点、50-10 =3点、10-3 =2点、3> =1点

とした。施設ごとに評価できるprobeのP/Nの得点を加算し、平均値を施設得点とした。

Templateの違いによるP/N比の評価: DNA溶液とろ紙フィルター付着DNAをTemplateとした場合ではP/N比に

違いが生じるかいないかを検定した。

DNA*: filter データを提出していない施設のみのデータである。

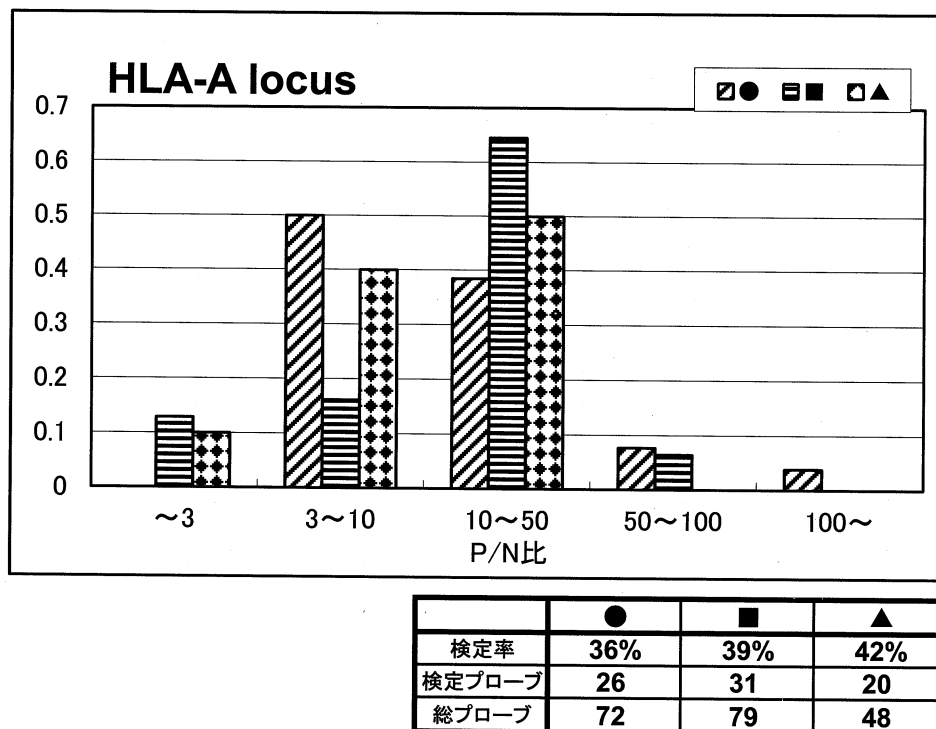


図1 A座検定プローブのP/N比分布; Kit別比較

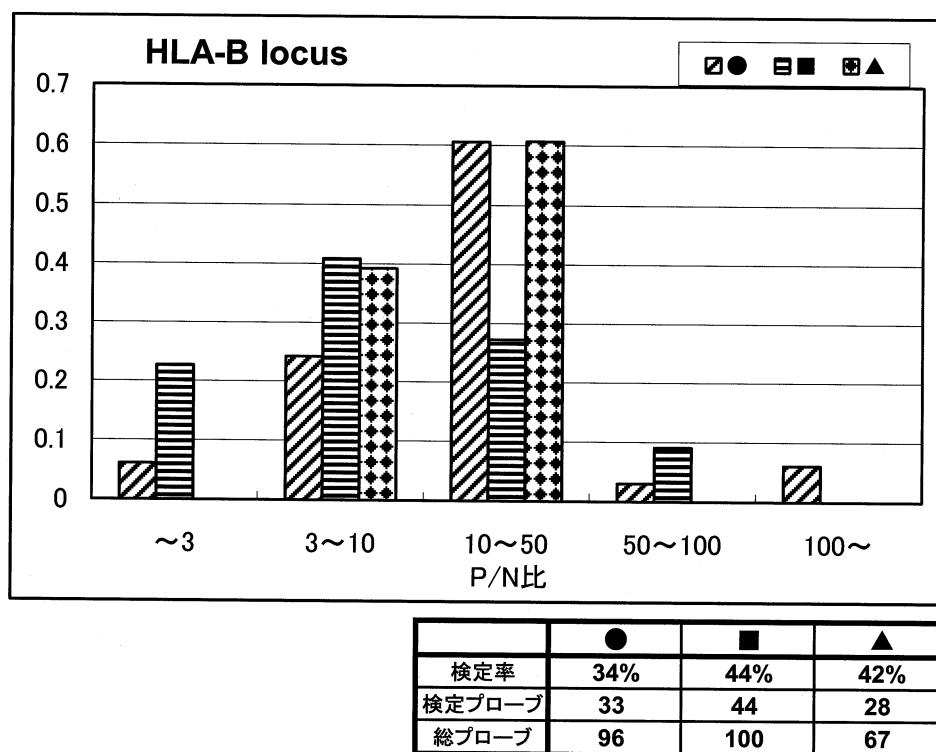


図2 B座検定プローブのP/N比分布; Kit別比較

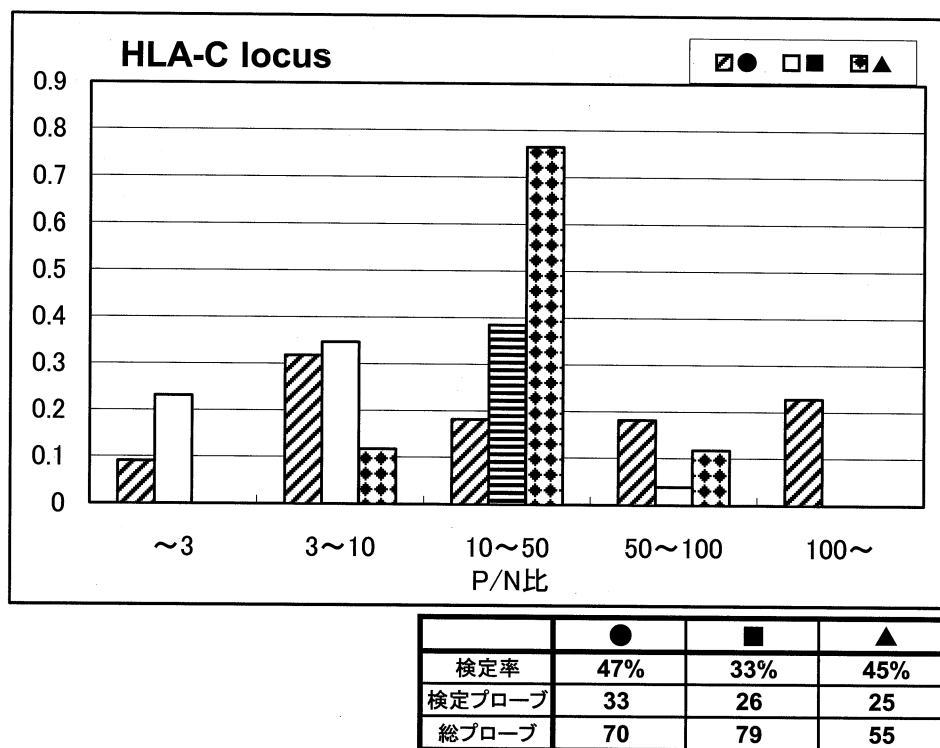


図3 C座検定プローブのP/N比分布; Kit別比較

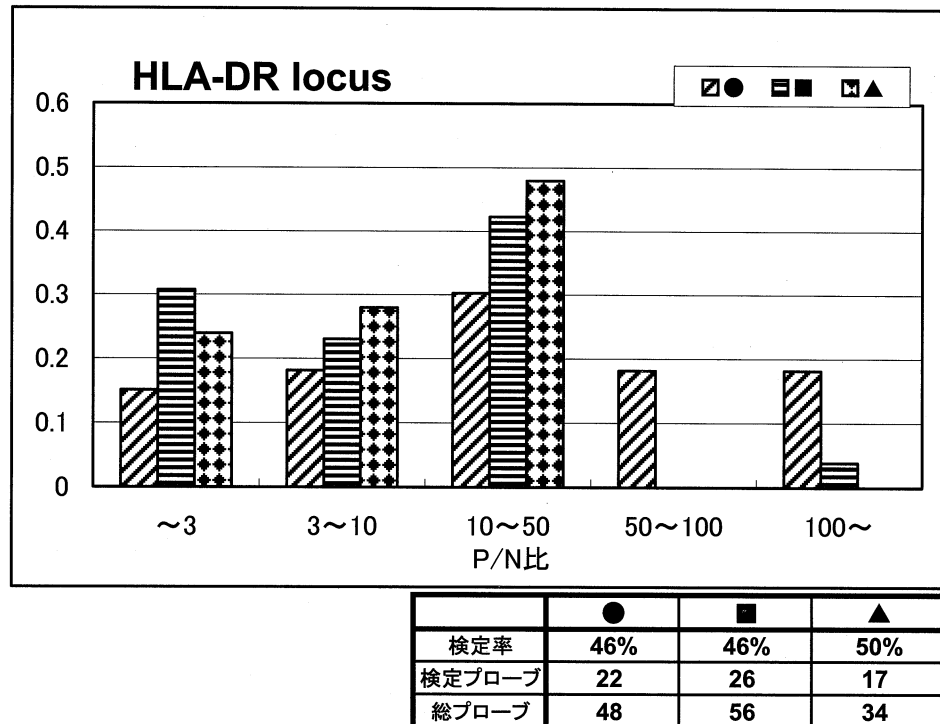


図4 DR座検定プローブのP/N比分布; Kit別比較

第11回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —方法論別検討 (SSP)—

安波道郎(長崎大学熱帯医学研究所), 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

SSP 法は PCR 法にて増幅される DNA 断片をアガロースゲル電気泳動法で検出するという, 特別な設備を必要としない方法であることから, 小規模の検査施設においても採用される機会が多く, またそのような設備では, 本法単独で型判定を余儀なくされることもあると思われる。今回のワークショップにおいても SSP 法の採用は参加施設中 23 施設から報告されたが, その使用目的としては

①主なタイピング法として 16 施設

と, 近年減少しつつあるものの, 単独の方法論に頼らざるを得ない状況の施設からのデータを比較することができ, いくつかの陥りやすい誤りに遭遇できた。また,

②他の方法の補助として, とくにアリルタイピングのため 7 施設

については, 他の方法でのタイピング結果の精度をあげることを目的としており, タイピングデータ自体, 別法の結果との整合がすでにチェックされているため問題となる例はなかった。

採用されているキットは

Class I + Class II のキットでは

One Lambda 社 MicroSSP Japanese (Lot #003)
7 施設

One Lambda 社 MicroSSP ABDR (Lot #006)
3 施設

Pel-Freez 社 ABDR SSP UNITRAY (Lot #31
他) 1 施設

Class I のキットでは

One Lambda 社 MicroSSP 1L (Lot #006) 5
施設

Pel-Freez 社 ABC SSP UNITRAY (Lot #34)
1 施設

Class II のキットでは

One Lambda 社 MicroSSP 2L (Lot #05A) 4
施設

の報告があった。

複数施設において採用されているキットについてその生データを比較したところ, 少数の偽陽性・偽陰性, またはデータの写し取りの間違いと思われる他施設の結果との不一致が 1 施設でみられた(ワークショップ集会資料として, 配布・提示済)。機器の動作を正しく管理し, メーカーの指定するキットの使用方法を遵守すれば, 偽陽性・偽陰性は完全に防止可能と思われた。ろ紙試料の検体については, 鋳型 DNA 量が限られることと, DNA がろ紙片に固着して多数の反応を行なうことが困難であることから, タイピングを避けた施設が多かったが, 全ゲノム増幅などの補助手技を用いることで SSP 法であってもほぼ確実なタイピングが可能と考えられた。また, タイピングの実施以降の問題としては, データの写し取りの間違い, 反応パターンの読み取りの間違い, 表記法の間違いなどが見受けられ, これらについては, SSP 法に限らず, 今後過誤を防止する努力を期待したい。

第11回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —方法別検討 SBT その他—

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), 日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会

1. はじめに

QC ワークショップも第11回を迎え, SBT (sequencing based typing), RFLP (restriction fragment length polymorphisms) の2法については参加者(施設)数も安定してきた(図1)。一方, SSCP (single strand conformation polymorphisms) 法は昨年姿を消したが今年度再び復活を果たしている。本稿ではこれら各方法での解析結果について述べる。なお, 各方法の概要, 操作法等については学会ホームページ, 各種関係書籍を参照願いたい。

2. SBT 法

2.1 概況

参加施設は全10施設で, クラスIIは昨年より1施設増加した。昨年同様, クラスIではほとんどの

表1 SBT 法参加施設と他法との選択状況

ID	Class I	Class II
19D006	SBT+SSO	SBT+SSO
19D007	SBT	SBT
19D009	SBT+SSO+SSP	SBT+SSO+SSP
19D010	SBT+SSO	SBT+SSO
19D014		SSO+SSCP
19D015	SBT+SSO	SBT+SSO+RFLP
19D016	SBT	SBT
19D017	SBT+SSO	SBT+SSO
19D024		SSP+SBT
19D027		SSO+RFLP
19D037	SBT+SSO	SBT+SSO
19D046		SSO+RFLP
19D051		SBT

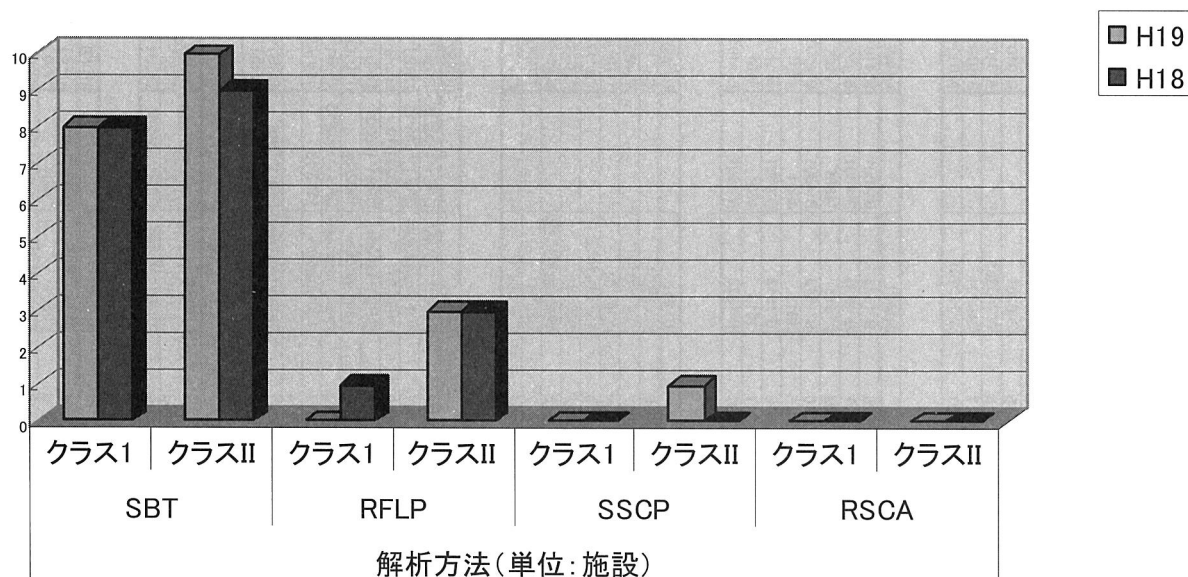


図1 H18, H19年度の参加施設数の推移

表 2 各施設におけるSBT 法判定結果回答

A									
ID	H1901	H1902	H1903	H1904	H1905	H1906	H1907	H1908	H1909
19D006	A*2402/05/09/+	A*0101/02/04/+	A*2402/05/09/+	A*2901/04/06/+	A*2402/05/09/+	A*2402/05/09/+	A*2402/05/09/+	A*2402/05/09/+	A*2402/05/09/+
19D007	A*2402/01/01	A*0101/01/01	A*2402/01/01	A*2901/01/01	A*2402/01/01	A*2402/01/01	A*2402/01/01	A*2402/01/01	A*2402/01/01
19D009	A*2402/01	A*0101/01	A*2402/01	A*2901/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01
19D010	A*2402/01/01	A*0101/01	A*2402/01/01	A*2901/01/01	A*2402/01/01	A*2402/01/01	A*2402/01/01	A*2402/01/01	A*2402/01/01
19D015	A*2402/01	A*0101/01	A*2402/01	A*2901/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01
19D016	A*2402/01	A*0101/01	A*2402/01	A*2901/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01
19D017	A*2402/01	A*0101/01	A*2402/01	A*2901/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01
19D037	A*2402/01	A*0101/01	A*2402/01	A*2901/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01	A*2402/01
B									
ID	H1901	H1902	H1903	H1904	H1905	H1906	H1907	H1908	H1909
19D006	B*1513	B*4101	B*1513	B*4002	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513
19D007	B*1513	B*4101	B*1513	B*4002	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513
19D009	B*1513	B*4101	B*1513	B*4002	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513
19D010	B*1513	B*4101	B*1513	B*4002	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513
19D015	B*1513	B*4101	B*1513	B*4002	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513
19D016	B*1513	B*4101	B*1513	B*4002	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513
19D017	B*1513	B*4101	B*1513	B*4002	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513
19D037	B*1513	B*4101	B*1513	B*4002	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513	B*1513
C									
ID	H1901	H1902	H1903	H1904	H1905	H1906	H1907	H1908	H1909
19D006	Cw*0801	Cw*1701/02/03	Cw*0801	Cw*1502/05/13	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*1203
19D007	Cw*0801	Cw*1701/02/03	Cw*0801	Cw*1502/05/13	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*1203
19D009	Cw*0801	Cw*1701/02/03	Cw*0801	Cw*1502/05/13	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*1203
19D010	Cw*0801	Cw*1701/02/03	Cw*0801	Cw*1502/05/13	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*1203
19D015	Cw*0801	Cw*1701/02/03	Cw*0801	Cw*1502/05/13	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*1203
19D016	Cw*0801	Cw*1701/02/03	Cw*0801	Cw*1502/05/13	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*1203
19D017	Cw*0801	Cw*1701/02/03	Cw*0801	Cw*1502/05/13	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*1203
19D037	Cw*0801	Cw*1701/02/03	Cw*0801	Cw*1502/05/13	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*0801	Cw*1203
DRB1									
ID	H1901	H1902	H1903	H1904	H1905	H1906	H1907	H1908	H1909
19D006	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1501/05
19D007	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1501/05
19D009	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1501/05
19D010	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1501/05
19D015	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1501/05
19D016	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1501/05
19D017	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1501/05
19D024	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1501/05
19D037	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1501/05
19D051	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1201/02	DRB1*1502/15	DRB1*1501/05
DQB1									
ID	H1901	H1902	H1903	H1904	H1905	H1906	H1907	H1908	H1909
19D009	DQB1*0301/01	DQB1*0502/01	DQB1*0301/01	DQB1*0502/01	DQB1*0301/01	DQB1*0502/01	DQB1*0301/01	DQB1*0502/01	DQB1*0501/01
19D010	DQB1*0301/01	DQB1*0502/01	DQB1*0301/01	DQB1*0502/01	DQB1*0301/01	DQB1*0502/01	DQB1*0301/01	DQB1*0502/01	DQB1*0501/01
DPB1									
ID	H1901	H1902	H1903	H1904	H1905	H1906	H1907	H1908	H1909
19D006	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501
19D009	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501
19D010	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501	DPB1*1401	DPB1*0501

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 遺伝子に集中していた。

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, RFLP 法との併用であった(表 1)。RFLP 法は, SBT での識別不可能な組み合わせの区別に用いられていた。試薬(キット)はほとんどの施設が AlleleSEQR を用いていた。販売元が変更になったこともありロットは異なっていたが、同一人物の管理する企業からの提供であるので、会社間で品質に大きな差はないと思われる。

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回答を表 2 に示した。表記や記載は回答のままとした。

本年度はすべてのラボで 4 桁, 6 桁レベルでの対立遺伝子の同定(特定)がなされた。SBT 法の特徴を活かすという部分においては、ようやくタイピング法として定着したことの表われであろう。一致率も高く、SBT 法が高精度タイピングに極めて有効であることが改めて確認された。しながら、H1901 の C 遺伝子座にみられた誤判定は、SBT 法が判定時に精査が必要であることを示唆している。C*050101 と C*080101 はエクソン 2 および 3 に 6 箇所の多型が存在する。H1901 はホモ接合対であることから、バックグラウンドが通常程度であれば、判定は比較的容易に行なえると思われる。

濾紙サンプルについては昨年同様、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、参加断念などがみられた。ろ紙抽出サンプルについては、全ゲノム増幅法を利用するの

も一案である。

H1906 は一昨年の H1701 と同一のサンプルである。そこで H1701 での回答と比較したところ、両者共に結果は良好であった。

3. RFLP 法および SSCP 法

3.1 概況

RFLP 法への参加は 3 施設で、ほとんどの遺伝子座で他法、特に SSO 法との併用により、一部の遺伝子や組み合わせを識別するために使用されていた。試薬は全施設が自家製であった。SSCP 法は、SSO 法との併用で、DRB1, DRB3/4/5, DQB1 遺伝子座の一部の遺伝子を識別するために使用された。

3.2 結果

解析に十分な数を得ることは出来なかったが、回答は他法での結果とよく一致していた。両方法とも、タイピング法としては既に確立しており、

4. まとめ

本年度もまた繰り返しのようになってしまいが、2 つある対立遺伝子のうち 1 つのみを目的にタイピングし、片方みの結果を解答欄に記入して、もう片方が空欄となっている施設が、SBT, SSCP 法の回答にみられたことは残念である。せっかくの判定も報告としては不十分となってしまうので、もう片方を nd で表すなど、データ提出前には表記を今一度確認していただきたい。SBT 法は高精度タイピング法として有効なタイピング法で、RFLP 法, SSCP 法もピンポイントでタイピングには実用的なタイピング法である。

第11回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —テーマ別検討 (WGA, ろ紙サンプル)—

太田正穂(信州大学医学部法医学), 日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会

1. はじめに

HLA-DNA 検査は、通常新鮮な血液から得られた良質の DNA を用いて行われるのが好ましい。しかし、日常の検査ではこのような試料を使用できないことが稀に遭遇する。そこで血液以外の試料(毛髪, 爪, 唾液, 口腔粘膜細胞, パラフィン切片)からでも検査可能な DNA 抽出キットが数多く発売され利用されている。さらに、微量試料からでも DNA タイピングを可能な全ゲノム増幅法 (WGA) も開発され利用されている。

ここでは、昨年度(第10回ワークショップ)から始まった WGA 産物からの HLA-DNA タイピング解析を本年度も試行したのでその結果について記載する。また、今回で5回目の試行となる濾紙に附着した試料からの HLA-DNA タイピング解析結果も報告する。

2. 検査試料・DNA 抽出法

WGA 産物サンプル (H1903) と濾紙サンプル (H1905, H1906) の調整は昨年の HLA-QC ワークショップと同様の方法で作成された (MHC, 13: 58-63, 2007)。濾紙サンプルからの DNA 抽出は QCWS 担当部会で推奨した標準プロトコールに従うことを前提に、タイピングは各参加施設で用いている手技に従った。

3. 結果と考察

1) 検査方法と施設数

a) WGA 産物サンプル (H1903)

H1903 サンプルのタイピングに用いた方法と施設数を表1に示した。ここには A, B, C, DRB1 座のタイピングについて示す。タイピング報告施設数は A

座 60, B 座 59, C 座 38, DRB1 座 60 で、多くの施設 (A: 73%, B: 72%, C: 65%, DRB1: 73%) は SSO 法に基づいた手技でタイピングを行っている。また、その内訳は表に示した通りである。次に報告例の多い方法は SSP 法であり、SBT 法は各遺伝子座につき 2~3 施設であった。さらに、2 法を用いてタイピングを行い、結果を提出した施設は A 座 8 施設, B 座 9 施設, C 座 8 施設, DRB1 座 12 施設であった。用いたタイピング法の多くは SSO 法であった。

b) 濾紙サンプル (H1905, H1906)

濾紙サンプル (H1905, H1906) のタイピングに参加した施設は、WGA に比べ少なく A 座 45, 42 施設, B 座 44, 40 施設, C 座 25, 26 施設, DRB1 座 47, 45 施設であった(表1)。濾紙サンプルでは、過去報告されたように感度の良い SSO 法を用いた手法が大多数であり(例, H1905: A 座 88%), そのなかで最も多く利用していたのは RELI 法であり、次は Luminex 法であった。

2) 判定結果一致率

a) WGA サンプル H1903

サンプル H1903 の検査結果提出施設数と検査結果の適合率を表2に示した。結果を提出した施設は 61 施設であり、最も多かったのは A 座と DRB1 座の 60 施設(98%)であり、次は B ローカスであった 59 施設(97%)。タイピング一致率は high resolution level では DQB1 ローカス以外総てのローカスで 100% であった。また、low/medium レベルでは A (98%), B (91%), DRB1 (98%) であり。いずれのローカスも高い一致率を示した。

タイピング結果が一致しなかった原因としては、誤判定、表記ミスであった(表2)。

表1 タイピング方法と使用施設数
(H1903)

Locus

A

(H1905)

(H1906)

検査方法	施設数	+					施設数	検査方法	施設数	+					
		SBT	MPH	SSP	RFLP	SSCP				SBT	MPH	SSP	RFLP	SSCP	
SSO	44					2	40	SSO	37						
RELI	22						22	RELI	20					1	
Luminex	19						17	Luminex	17						
G&G	6	1	1				6	G&G	6					1	
One	7	3					5	One	5					2	
Waku	6	1					6	Waku	6						
MPH	3						1	MPH							
SSP	14						4	SSP	3						
One	12						3	One	3						
Pel	2						1	Pel							
SBT	2						1	SBT	2						
		60							42						

B

検査方法	施設数					施設数					検査方法	施設数																										
	SSO	43	REL	22	Luminex	19	SSO	39	REL	22		Luminex	16	SSO	37	REL	19																					
SSP	One	Pel	2	12	2	14	SSP	4	SSP	3	One	Pel	2	SSP	2	SSP	1																					
																		MPH	2	6	1	3	6	1	6	3	6	1										
																													One	7	4	6	3	6	5	6	3	
																																						Waku
SSCP	2	2	2	2	2	2	SSCP	1	SSCP	1	SSCP	1	SSCP	1	SSCP	1																						
																	MPH	2	6	1	3	6	1	6	3	6	5	6	3									
																														One	7	4	6	3	6	5	6	3
SBT	2	2	2	2	2	2	SBT	1	SBT	1	SBT	1	SBT	1	SBT	1																						
																	MPH	2	6	1	3	6	1	6	3	6	5	6	3									
																														One	7	4	6	3	6	5	6	3

表1 つづき

Locus

(H1903)

(H1905)

(H1906)

C	(H1903)		(H1905)		(H1906)	
	検査方法	施設数	検査方法	施設数	検査方法	施設数
	SSO	25	SSO	22	SSO	22
	RELI	8	RELI	7	RELI	6
	Luminex	14	Luminex	14	Luminex	15
	G&G	5	G&G	5	G&G	5
	One	5	One	4	One	5
	Waku	4	Waku	5	Waku	5
	MPH	3	MPH	1	MPH	1
	SSP	10	SSP	2	SSP	2
	One	9	One	2	One	2
	Pel	1	Pel		Pel	
	SBT	3	SBT	1	SBT	2
		38		25		26

DRB1	(H1903)		(H1905)		(H1906)	
	検査方法	施設数	検査方法	施設数	検査方法	施設数
	SSO	44	SSO	39	SSO	38
	RELI	22	RELI	21	RELI	20
	Luminex	19	Luminex	17	Luminex	17
	G&G	6	G&G	6	G&G	6
	One	7	One	5	One	5
	Waku	6	Waku	6	Waku	6
	MPH	3	MPH	1	MPH	1
	SSP	13	SSP	4	SSP	3
	One	12	One	3	One	3
	Pel	1	Pel	1	Pel	
	SBT	3	SBT	4	SBT	4
		60		47		45

表 2 結果提出施設数とタイピング一致率 (H1903)

遺伝子座	結果提出施設数 N=61 (%)		コンセンサス DNA型	コンセンサス HLA型	Low/Medium		High		総合一致率(%)
					結果(%)	一致率(%)	結果(%)	一致率(%)	
HLA-A	60	98	*2402,*-	A24,A-	53/60 (88)	52/53 (98)	7/60 (12)	7/7 (100)	59/60 (98)
HLA-B	59	97	*1513,*4801	B77(15), B48	46/59 (78)	42/46 (91)	13/59 (22)	13/13 (100)	55/59 (93)
HLA-C	38	62	*0801,*-		10/25 (40)	9/10 (90)	15/25 (60)	15/15 (100)	24/25 (96)
HLA-DRB1	60	98	*1202,*1502	DR12, DR15	50/60 (83)	49/50 (98)	10/60 (17)	10/10 (100)	59/60 (98)
HLA-DRB3/4/5	33	54	B5*0101,B3*0301	DR51, DR52	29/33 (88)	24/29 (83)	4/33 (12)	4/4 (100)	28/33 (85)
HLA-DQA1	2	3	*01, *06		2/2 (100)	2/2 (100)			2/2 (100)
HLA-DQB1	24	39	*0502,*0301	DQ5, DQ7	19/24 (79)	17/19 (89)	5/24 (21)	4/5 (80)	21/24 (88)
HLA-DPB1	4	7	*0501,*1401				4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)

low, highは解析結果に示されたタイプに基づく

コメント

A座:誤判定(A*2402/03/04/+, A*2609)

B座:表記ミスとB75(B*1502/88)

C座:誤判定(Cw*0208, Cw*0801/02/03/+)

DRB1座:アリルdrop out

DRB3/4/5座:表記ミス(B3*表記なし, *なし, B3*0101/02/03/+)

DQB1座: 表記ミス

表 3 結果提出施設数とタイピング一致率 (H1905)

遺伝子座	結果提出施設数 N=61 (%)		コンセンサス DNA型	コンセンサス HLA型	Low/Medium		High		総合一致率(%)
					結果(%)	一致率(%)	結果(%)	一致率(%)	
HLA-A	45	74	*2402,*-	A24,A-	42/45 (93)	41/42 (98)	3/45 (7)	3/3 (100)	44/45 (98)
HLA-B	44	72	*1513,*4801	B77(15), B48	35/44 (80)	33/35 (94)	9/44 (20)	8/9 (89)	41/44 (93)
HLA-C	25	41	*0801,*-		20/25 (80)	19/20 (95)	5/25 (20)	5/5 (100)	24/25 (96)
HLA-DRB1	47	77	*1202,*1502	DR12, DR15	39/47 (83)	38/39 (97)	8/47 (17)	8/8 (100)	46/47 (98)
HLA-DRB3/4/5	23	38	B5*0101,B3*0301	DR51, DR52	19/23 (83)	23/23 (100)	4/23 (17)	4/4 (100)	23/23 (100)
HLA-DQA1	2	3	*01, *06		2/2 (100)	2/2 (100)			2/2 (100)
HLA-DQB1	14	23	*0502,*0301	DQ5, DQ7	10/14 (71)	8/10 (80)	4/14 (29)	3/4 (75)	11/14 (79)
HLA-DPB1	5	8	*0501,*1401				5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)

low, highは解析結果に示されたタイプに基づく

コメント

A座:誤判定(A*2402/33, A*1101/02/03/+)

B座:表記ミスとB75(B*1502/88), 誤判定(B*1502, B*5502/13/16/+); B*4803

C座:誤判定(Cw*0801/02/03/+, Cw*1203/04/06/+), *表記なし

DRB1座:誤判定(DRB1*1501/02/03/+, DRB1*1402/05/06/+)

DRB3/4/5座:*なし

DQB1座: 表記ミス(DQB1*0301, DQB1*0301), 誤判定(DQB1*0501/02/03/+, DQB1*0601/02/03/+). アリルdrop out

表 4 結果提出施設数とタイピング一致率 (H1906)

遺伝子座	結果提出施設数 N=61 (%)		コンセンサス DNA型	コンセンサス HLA型	Low/Medium		High		総合一致率(%)
					結果(%)	一致率(%)	結果(%)	一致率(%)	
HLA-A	42	69	*1101,*2403	A11, A24	41/42 (98)	38/41 (93)	1/42 (2)	1/1 (100)	39/42 (93)
HLA-B	40	67	*1502,*5502	B75(15), B55	33/40 (83)	33/33 (100)	7/40 (17)	7/7 (100)	40/40 (100)
HLA-C	26	43	*0801,*1203		19/26 (73)	18/19 (95)	7/26 (27)	5/7 (71)	23/26 (88)
HLA-DRB1	45	74	*1405,*1501	DR14, DR15	38/45 (84)	38/38 (100)	7/45 (16)	7/7 (100)	45/45 (100)
HLA-DRB3/4/5	21	34	B5*0101,B3*0202	DR51, DR52	17/21 (81)	16/17 (94)	4/21 (19)	3/4 (75)	19/21 (90)
HLA-DQA1	2	3	*01, *06		1/2 (50)	1/2 (50)			1/2 (50)
HLA-DQB1	13	21	*0502,*0601	DQ5, DQ6	3/13 (23)	2/3 (67)	10/13 (77)	10/10 (100)	12/13 (92)
HLA-DPB1	5	8							

low, highは解析結果に示されたタイプに基づく

コメント

A座:誤判定(A*2410, A*1115); アリルdrop out; ?= A*240301/02/2433 B座: 62と表記; B55 or B56; B15, B55/B56

C座:誤判定(Cw*0801, Cw*1604; Cw*0804, Cw*1203; Cw*0805/08, Cw*0808) DRB1座:DRB1*140501/08/45

DRB3/4/5座:1誤判定(DRB3*0301, DRB5*0101; B30215, B50101/02/03/+) DQB1座: 誤判定(DQB1*03, DQB1*05)

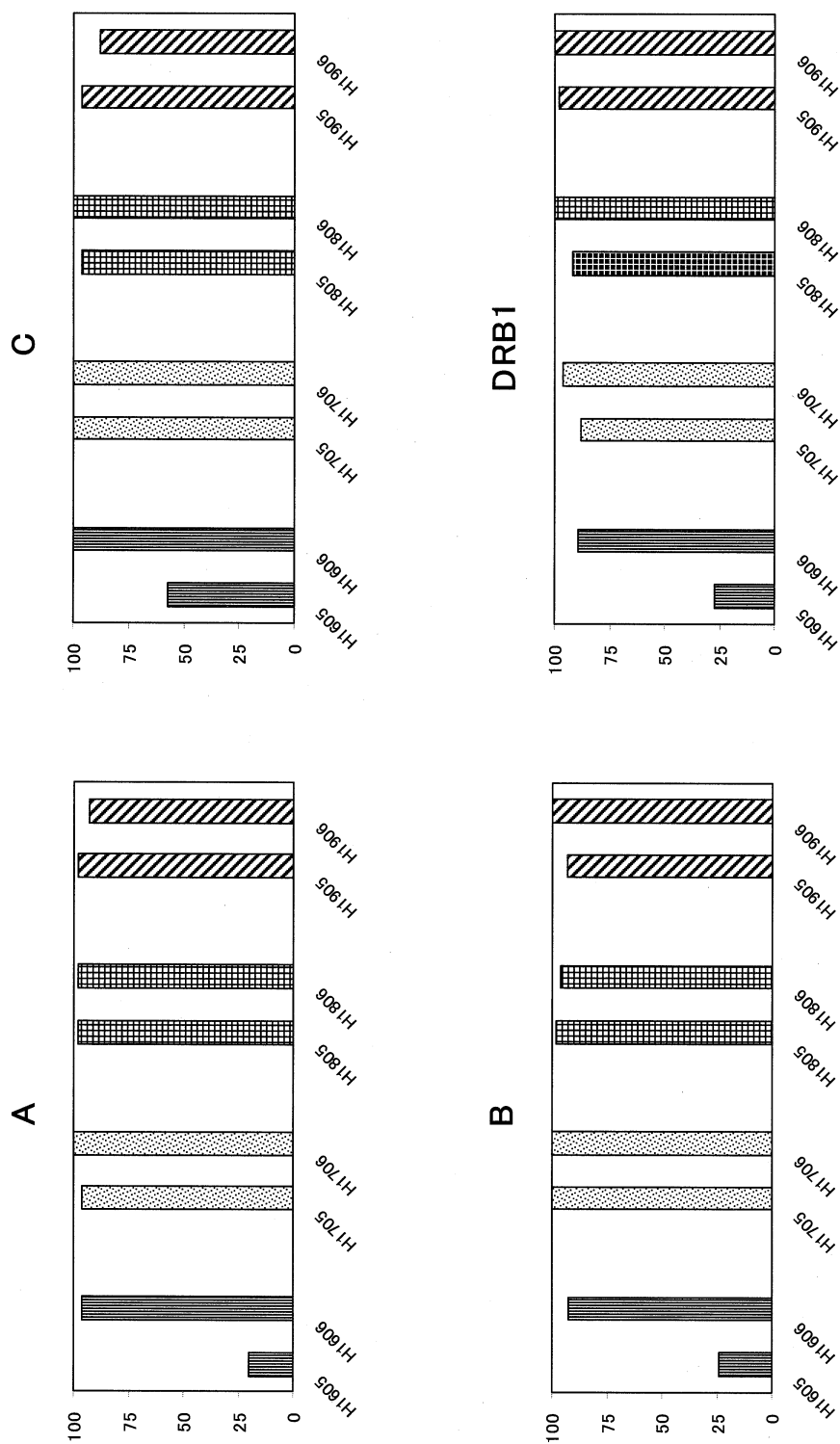
b) 濾紙サンプル H1905

サンプル H1905 の検査を表 3 に示した。ワーク
ショップ解析参 61 施設のうち、最も多く解析結果を
提出したのは DRB1 座の 47 施設(77%)であり、次
は A ローカスの 45 施設(74%)であった。参加施設
においてタイピングを試みたローカスは DRB1, B,

A, が多く(> 70%), C, DQB1 が次に多い。DQA1
と DPB1 については極端に少なかった(< 10%)。こ
の傾向は検査施設で日常の検査に用いているキット
や手法に準じているものと思われる。

タイピング結果の型一致率は high resolution level
では B, DQB1 ローカス以外の総てのローカスで

図1 HLA-DNA タイピング正答率の推移 (平成16年~19年)



100%であった。B, DQB1 でのミス回答は何れも 1 施設だった。また, low/medium レベルでは A, B, C, DRB1 の一致率が 100% ではなかったが, ミス報

告をしたのは参加施設中 1 施設であった。ミス報告の原因は, WGA での報告と同様誤判定, 表記ミスによるものであった(表 3)。

c) 濾紙サンプル H1906

サンプル H1906 の検査を表 4 に示した。ワークショップ解析参 61 施設のうち、最も多く解析結果を提出したのは DRB1 座の 47 施設(74%)であり、次は A ローカスの 45 施設(69%)であり、サンプル H1905 での報告結果と同じであった。タイピング結果の型一致率は high resolution level で C ローカスに 2 施設のミス報告が見られたが、A, B, DRB1 ローカスでは 100% であった。例えば、A ローカスでのミス報告は、A*2401 を A*2410 と記述、ヘテロのタイプであるのに Homozygote と報告、4 桁と 6 桁が混合した記述をしていた(表 4)。このようにミス判定の原因を表 4 に記載した。

濾紙に附着させた培養細胞からの HLA-DNA タイピングは今回が 5 回目の試みである。本年を含め過去 4 年間の A, B, C, DRB1 ローカスにおける総合的

(high と low/medium) タイピング一致率の推移を見ると(図 1), H16 年度は成績が良くないサンプルが見られたが、H17~H19 年度においてはどれも 90% を超える成績を示している。濾紙からの DNA 回収と HLA-DNA タイピングに関しては、参加施設の手法が概ね完成度の高いレベルに達していると考えられる。今後の課題としては、ワークショップに使用する試料をこれまで配布した培養細胞からの DNA ではなく、出来る限り日常業務で扱う日本人の血液が使用できるかである。

WGA は微量試料からのタイピングには有効な手法である。この手法と HLA-DNA タイピングを組み合わせた真の有効性を見るには、今後、今までワークショップで行って来た手順とは異なり、微量サンプルを各施設の WGA 操作で増幅し、提出されたタイピング結果を解析することが必要であろう。

第 11 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(東京都赤十字血液センター検査部), 日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会

1. 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

遺伝子座名および対立遺伝子を意味するアスタリスク “*” の付記は、DNA タイピングの結果表記の基本である。しかし、HLA-A 座の DNA タイピングを実施した 59 施設の結果では、9 施設(15.3%)で遺伝子座およびアスタリスクの両方が記載されておらず、6 施設(10.2%)で遺伝子座名が記載されていなかった。また、アンビギュイティの表記を含め、正しく表記されていた施設は 35 施設(59.3%)であった(表 1 参照)。

提出された結果で、全角文字の場合、全角と半角文字が混在している場合、アスタリスクが“※”(米印)で入力されている場合などが見られた。また、

表1 結果表記集計例 (Sample: H1901, HLA-A locus)

No.	結 果	施設数	*	Locus	ambiguity
1	2402/03/04/+	1	×	×	○
2	2402/05/09/+	1	×	×	○
3	2402/05/07/+	1	×	×	○
4	2402/07/09/+	1	×	×	○
5	2402/09/11/+	2	×	×	○
6	2402/09N/+	1	×	×	×
7	2402/20	1	×	×	○
8	240201	2	×	×	○
9	*24	1	○	×	△
10	*2402/03/04/+	2	○	×	○
11	*2402/05/09N/+	1	○	×	×
12	*2402/09/11/+	2	○	×	○
13	*2402/09N/11N/+	1	○	×	×
14	*240201	1	○	×	○
15	* 24	1	△	×	△
16	※2402/05/09/+	1	×	×	○
17	A*24	3	○	○	△

No.	結 果	施設数	*	Locus	ambiguity
18	A*2402/+	1	○	○	×
19	A*2402/03/04/+	6	○	○	○
20	A*2402/05/07/+	1	○	○	○
21	A*2402/05/09/+	6	○	○	○
22	A*2402/05/09/+	1	○	○	○
23	A*2402/05/09N/+	2	○	○	×
24	A*2402/05/11/+	1	○	○	○
25	A*2402/07/09/+	2	○	○	○
26	A*2402/09/11/+	6	○	○	○
27	A*2402/09/20/+	1	○	○	○
28	A*2402/17/20/+	1	○	○	○
29	A*2402/32/34/+	1	○	○	○
30	A*2402/34/35/+	1	○	○	○
31	A*240201	2	○	○	○
32	A*24020101	2	○	○	○
33	HLA-A*2402/03/+	1	○	○	×
34	HLA-A*2402/03/05/+	1	○	○	○

対象施設数:59施設 表記パターン:34種類

正しく結果表記が出来た施設数:35施設 (59.3%)

表2 結果集計に伴うデータ変更

	変更の対象	変更した内容
1	ローカス名および“*”(アステリスク)の追加	例:*020101→A*020101 例:020101→A*020101
2	空 欄 処 理	
	①結果が片方にカラムに入力されている場合	①空欄にブランクを意味する “-”(ハイフン)を入力した
2	②結果が両方のカラムに入力がされていない場合	②変更は行わず、“空欄”として集計した。(本来はN.T.の入力が必要)
3	判定不能、判定不可、undf、増幅しない	undefに変更
4	未検査 および nt	N.T.に変更

ローカス名では、以下の表記(入力)間違いが見られ、結果提出の際に十分な確認が必要である。

- ①Cw → C または CW, ②DRB1 → DRB または DR,
③DRB3 → 3 または B3

2.1. アリル表記の結果集計および問題点

提出された結果の表記パターンが多いため、表記

結果の集計には一部の結果表記を変更し(表2参照)集計を行った。集計はローカスごとに行い、表記法に従っていない結果表記、またはタイピング結果が間違っている結果表記について、表中に網掛けで示した(表3~8)。

① 区分出来ないアリルの表記

HLA-A*24, A*11, B*48, B*41, Cw*08, Cw*07,

表3 HLA-A ローカス表記の集計

Sample :H1901(N=61)					
Allele:A*24020101					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	A*24	5	1	-	57
2	A*2402/+	1	2	A*2402/03/04/+	1
3	A*2402/03/04/+	9	3	A*2402/05/09/+	1
4	A*2402/05/07/+	2	4	N.T.	2
5	A*2402/05/09/+	9			
6	A*2402/05/09N/+	3			
7	A*2402/05/11/+	1		(以下左欄からの続き)	
8	A*2402/07/09/+	3	15	A*2402/32/34/+	1
9	A*2402/09/11/+	10	16	A*2402/34/35/+	1
10	A*2402/09/20/+	1	17	A*240201	5
11	A*2402/09N/+	1	19	A*24020101	2
12	A*2402/09N/11N/+	1	19	HLA-A*2402/03/+	1
13	A*2402/17/20/+	1	20	HLA-A*2402/03/05/+	1
14	A*2402/20	1	21	N.T.	2

Sample :H1902 (N=61)					
Allele:A*010101					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	A*01	4	1	A*01	58
2	A*0101	2	2	A*0101/02/03/+	1
3	A*0101/+	1	3	A*0101/04/09/+	1
4	A*0101/02/03/+	11	4	A*0201/02/03/+	1
5	A*0101/02/04/+	3			
6	A*0101/03/04N/+	4			
7	A*0101/04/08/+	3			
8	A*0101/04/09	4		(以下左欄からの続き)	
9	A*0101/04/09/+	13	15	A*010101	6
10	A*0101/04N/+	1	16	A*01010101	1
11	A*0101/04N/09/+	1	17	A*1	1
12	A*0101/08/09/+	1	18	HLA-A*0101/02/+	1
13	A*0101/09	1	19	HLA-A*0101/3604/+	1
14	A*0101/11/16/+	1	20	N.T.	1

Sample :H1903 (N=61)					
Allele:A*24020101					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	A*24	5	1	-	57
2	A*2402/+	1	2	A*2402/03/04/+	1
3	A*2402/03/04/+	8	3	A*2402/05/09/+	1
4	A*2402/05/07/+	2	4	A*2609	1
5	A*2402/05/09/+	10	5	N.T.	1
6	A*2402/05/09N/+	3			
7	A*2402/05/11/+	1		(以下左欄からの続き)	
8	A*2402/07/09/+	3	15	A*2402/32/34/+	1
9	A*2402/09/11/+	11	16	A*2402/34/35/+	1
10	A*2402/09/20/+	1	17	A*240201	5
11	A*2402/09N/+	1	18	A*24020101	2
12	A*2402/09N/11N/+	1	19	HLA-A*2402/03/+	1
13	A*2402/17/20/+	1	20	HLA-A*2402/03/05/+	1
14	A*2402/20	1	21	N.T.	1

Sample :H1904 (N=61)					
Allele:A*110101			Allele:A*29010101		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	A*11	5	1	-	7
2	A*110//02/03/+	1	2	A*1102/03/04/+	1
3	A*1101	1	3	A*2901	3
4	A*1101/+	1	4	A*2901/+	1
5	A*1101/02	1	5	A*2901/02/+	1
6	A*1101/02/+	1	6	A*2901/02/03/+	8
7	A*1101/02/03/+	30	7	A*2901/02/04/+	28
8	A*1101/03/05/+	5	8	A*2901/04/06/+	1
9	A*1101/03/06/+	2	9	A*2901/12/15/+	2
10	A*1101/03/07/+	2	10	A*290101	5
11	A*1101/21	2	11	A*29010101	1
12	A*1101/21/22	1	12	HLA-A*2901/12	2
13	A*110101	5	13	N.T.	1
14	A*1102/03/04/+	1			
15	HLA-A*1101/03	1			
16	HLA-A*1101/03/06/+	1			
17	N.T.	1			

Sample :H1905 (N=61)					
Allele:A*24020101					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	空欄	9	1	空欄	9
2	A*2402/+	1	2	-	46
3	A*2402/03/04/+	3	3	N.T.	3
4	A*2402/05/07/+	3	4	undef	3
5	A*2402/05/09/+	9			
6	A*2402/05/09N/+	3			
7	A*2402/05/11/+	1		(以下左欄からの続き)	
8	A*2402/07/09/+	1	16	A*2402/32/34/+	1
9	A*2402/09/11/+	11	17	A*2402/34/35/+	1
10	A*2402/09/20/+	1	18	A*240201	2
11	A*2402/09N/+	1	19	A*24020101	1
12	A*2402/09N/11N/+	1	20	HLA-A*2402/03/+	1
13	A*2402/11N/40N	1	21	HLA-A*2402/03/05/+	1
14	A*2402/17/20/+	1	22	N.T.	3
15	A*2402/20	1	23	undef	4

Sample :H1906 (N=56)					
Allele:A*110101			Allele:A*2403		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	空欄	10	1	空欄	10
2	-	1	2	-	1
3	A*11	1	3	A*24	1
4	A*1101/+	1	4	A*2401/03/04/+	1
5	A*1101/02/+	1	5	A*2402/03/04/+	1
6	A*1101/02/03/+	20	6	A*2402/03/05/+	2
7	A*1101/02/07/+	1	7	A*2402/05/09/+	1
8	A*1101/03/04/+	6	8	A*2402/09/11/+	1
9	A*1101/03/05/+	2	9	A*2403	1
10	A*1101/03/07/+	1	10	A*2403/+	1
11	A*1101/04	3	11	A*2403/10	2
12	A*1101/21/22	1	12	A*2403/10/22/+	14
13	A*110101	1	13	A*2403/10/23/+	1
14	A*1115	1	14	A*2403/10/33	1
15	HLA-A*1101/03/+	1	15	A*2403/22/23	1
16	HLA-A*1101/03/04/+	1	16	A*2403/22/23/+	2
17	N.T.	4	17	A*2403/22/33	1

表4 HLA-B ローカス表記の集計

Sample :H1901 (N=61)				
Allele:B*4801			Allele:B*1513	
	Local Assignment	件数		Local Assignment 件数
1	空欄	2	1	空欄 2
2	B*48	5	2	- 1
3	B*4801	14	3	B*15 3
4	B*4801/03/04/+	1	4	B*1502/88 1
5	B*4801/04	2	5	B*1513 49
6	B*4801/04/09/+	2	6	B*1513/89 2
7	B*4801/04/09/11	1	7	B*530102 1
8	B*4801/07	1	8	HLA-B*1502/88 1
9	B*4801/09	5	9	HLA-B*1513 1
10	B*4801/09/10/+	14		
11	B*4801/09/11	10		
12	B*4803	1		
13	HLA-B*4801/04/+	1		
14	HLA-B*4801/04/09/+	1		
15	undef	1		

Sample :H1902 (N=61)				
Allele:B*4101				
	Local Assignment	件数		Local Assignment 件数
1	空欄	1	1	空欄 1
2	B*1577	1	2	- 57
3	B*41	5	3	B*4101/03/06 1
4	B*4101	10	4	B*4101/06/07 1
5	B*4101/02/03/+	1	5	B*4501/03/04/+ 1
6	B*4101/03/05/+	1		
7	B*4101/03/06	1		
8	B*4101/03/06/+	6		(以下左欄からの続き)
9	B*4101/04/05/+	1	14	B*4101/06 2
10	B*4101/05/06	6	15	B*4101/07 2
11	B*4101/05/06/+	17	16	HLA-B*4101/05/+ 1
12	B*4101/05/06/07	1	17	HLA-B*4101/05/06/+ 1
13	B*4101/05/07/+	1	18	undef 3

Sample :H1903 (N=61)				
Allele:B*4801			Allele:B*1513	
	Local Assignment	件数		Local Assignment 件数
1	空欄	1	1	空欄 1
2	B*48	5	2	- 1
3	B*4801	14	3	B*15 3
4	B*4801/03/04/+	1	4	B*1502/88 1
5	B*4801/04	2	5	B*1513 48
6	B*4801/04/09/+	2	6	B*1513/89 3
7	B*4801/04/09/11	1	7	B*530102 1
8	B*4801/07	2	8	HLA-B*1502/88 1
9	B*4801/07/09/+	1	9	HLA-B*1513 1
10	B*4801/09	5	10	undef 1
11	B*4801/09/10/+	1		
12	B*4801/09/10/+	15		
13	B*4801/09/11	8		
14	HLA-B*4801/04/+	1		
15	HLA-B*4801/04/09/+	1		
16	undef	1		

Sample :H1904 (N=61)				
Allele:B*070501			Allele:B*400201	
	Local Assignment	件数		Local Assignment 件数
1	空欄	1	1	空欄 1
2	B*07	5	2	- 1
3	B*0702/03/04/+	1	3	B*40 5
4	B*0702/04	1	4	B*4002 4
5	B*0705	2	5	B*4002/+ 1
6	B*0705/+	1	6	B*4002/03/04/+ 1
7	B*0705/06	25	7	B*4002/03/08+ 1
8	B*0705/06/17	11	8	B*4002/03/08/+ 2
9	B*0705/06/17/+	3	9	B*4002/04/09/+ 2
10	B*0705/06/28	4	10	B*4002/08/09/+ 6
11	B*0705/06/40	3	11	B*4002/09/27/+ 3
12	B*070501	1	12	B*4002/09/27/+ 1
13	HLA-B*0705/06/+	1	13	B*4002/16/19/+ 1
14	HLA-B*0705/06/40	1	14	B*4002/27/29/+ 14
15	undef	1	15	B*4002/27/35/+ 4
			16	B*4002/27/40/+ 2
			17	B*4002/29 1
	(以下右欄からの続き)		18	B*4002/35/37 1
21	HLA-B*4002/27/+	1	19	B*4002/56/57 2
22	HLA-B*4002/27/35/+	1	20	B*400201 6

Sample :H1905 (N=57)				
Allele:B*4801			Allele:B*1513	
	Local Assignment	件数		Local Assignment 件数
1	空欄	9	1	空欄 9
2	B*4801	10	2	- 2
3	B*4801/03/04/+	1	3	B*1502/88 1
4	B*4801/04	2	4	B*1513 39
5	B*4801/04/09/+	2	5	B*1513/89 2
6	B*4801/04/09/11	1	6	HLA-B*1502/88 1
7	B*4801/09	5	7	HLA-B*1513 1
8	B*4801/09/10/+	15	8	N.T. 3
9	B*4801/09/11	5	9	undef 3
10	B*4803	1		
11	HLA-B*4801/04/+	1		

Sample :H1906 (N=57)				
Allele:B*1502			Allele:B*550201	
	Local Assignment	件数		Local Assignment 件数
1	空欄	10	1	空欄 10
2	B*1502	14	2	- 2
3	B*1502//88	1	3	B*5501/02/+ 1
4	B*1502/88	20	4	B*5501/02/05+ 2
5	B*1502/88/9512/+	1	5	B*5501/02/05/+ 20
6	B*1502/9512	1	6	B*5502 6
7	B*1502/9521	2	7	B*5502/07/12/+ 1
8	HLA-B*1502/88	2	8	B*5502/12 1
9	N.T.	5	9	B*5502/12/16/+ 1
10	undef	5	10	B*5502/13/16/+ 1
			11	B*5502/16 1

表5 HLA-C ローカス表記の集計

Sample :H1901 (N=59)					
Allele:Cw*0801					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	空欄	20	1	空欄	20
2	Cw*08	5	2	-	37
3	Cw*0801	3	3	Cw*0801/02/03/+	1
4	Cw*0801/02/03/+	6	4	N.T.	1
5	Cw*0801/03/04/+	5			
6	Cw*0801/04/08	1			
7	Cw*0801/04/08/+	4			
8	Cw*0801/06	1			
9	Cw*0801/08	4			
10	Cw*080101	7			
11	HLA-Cw*0801/04+	1			
12	HLA-Cw*0801/04/08/+	1			
13	N.T.	1			

Sample :H1902 (N=38)					
Allele:Cw*17					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	空欄	19	1	空欄	19
2	Cw*0202/03/04/+	1	2	-	35
3	Cw*07	2	3	Cw*1201/02/03/+	1
4	Cw*07/12/17	1	4	Cw*1701/02/03	1
5	Cw*17	1	5	N.T.	1
6	Cw*1701	1	6	undef	2
7	Cw*1701/02/03	16			
8	Cw*1701/02/03/+	13			
9	HLA-Cw*1701/02/+	1			
10	HLA-Cw*1701/02/03/+	1			
11	N.T.	1			
12	undef	2			

Sample :H1903 (N=59)					
Allele:Cw*080101					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	空欄	21	1	空欄	21
2	Cw*08	5	2	-	35
3	Cw*0801	3	3	Cw*0208	1
4	Cw*0801/02/03/+	5	4	Cw*0801/02/03/+	1
5	Cw*0801/03/04/+	5	5	N.T.	1
6	Cw*0801/04/06/+	1			
7	Cw*0801/04/08	1			
8	Cw*0801/04/08/+	3			
9	Cw*0801/06	1			
10	Cw*0801/08	4			
11	Cw*080101	7			
12	HLA-Cw*0801/04+	1			
13	HLA-Cw*0801/04/08/+	1			
14	N.T.	1			

Sample :H1904 (N=59)					
Allele:Cw*150201			Allele:Cw*1505		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	空欄	19	1	空欄	19
2	Cw*15	4	2	-	20
3	Cw*1502	2	3	Cw*03/15	1
4	Cw*1502/03/05	5	4	Cw*1502/05/06/+	1
5	Cw*1502/03/05/+	2	5	Cw*1502/13	1
6	Cw*1502/04/05/+	3	6	Cw*1505	8
7	Cw*1502/05	1	7	Cw*1505/06	1
8	Cw*1502/05/06/+	5	8	Cw*1505/13	5
9	Cw*1502/05/13	1	9	Cw*150501/0502/0503	1
10	Cw*1502/07/08/+	2	10	HLA-Cw*1505/13	1
11	Cw*1502/11/13/+	3	11	N.T.	1
12	Cw*1502/13	2			
13	Cw*150201	5			
14	Cw*1505	1			
15	Cw*1512	1			
16	HLA-Cw*1502/05	1			
17	HLA-Cw*1502/05/13	1			
18	N.T.	1			

Sample :H1905 (N=59)					
Allele:Cw*080101					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	空欄	28	1	空欄	28
2	Cw*0801	2	2	-	27
3	Cw*0801/02/03/+	2	3	N.T.	4
4	Cw*0801/02/04/+	1			
5	Cw*0801/03/04/+	4			
6	Cw*0801/04/08/+	4			
7	Cw*0801/08	5			
8	Cw*080101	4			
9	HLA-Cw*0801/04+	1			
10	HLA-Cw*0801/04/08/+	1			
11	N.T.	4			
12	undef	3			

Sample :H1906 (N=59)					
Allele:Cw*080101			Allele:Cw*120301		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	空欄	27	1	空欄	27
2	Cw*0801	2	2	-	1
3	Cw*0801/02/03/+	1	3	Cw*0808	1
4	Cw*0801/03/04/+	4	4	Cw*1203	1
5	Cw*0801/04/08/+	1	5	Cw*1203/03/07/+	1
6	Cw*0801/08	9	6	Cw*1203/04/06/+	1
7	Cw*0801/08/09	1	7	Cw*1203/06/07	1
8	Cw*080101	4	8	Cw*1203/06/07/+	12
9	Cw*0805/08	1	9	Cw*1203/06/12/+	1
10	HLA-Cw*0801/08	1	10	Cw*120301	4
11	HLA-Cw*0804	1	11	Cw*1604	1
12	N.T.	4	12	HLA-Cw*1203	1
13	undef	3	13	HLA-Cw*1203/06/07/+	1
			14	N.T.	4
			15	undef	2

表6 HLA-DRB1 ローカス表記の集計

Sample :H1901 (N=61)				
Allele:DRB1*120201			Allele:DRB1*150201	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 空欄	2	1 空欄	2	
2 DRB1*12	4	2 DRB1*15	4	
3 DRB1*1201/02/03/+	11	3 DRB1*1501	1	
4 DRB1*1201/02/06/+	2	4 DRB1*1501/02	1	
5 DRB1*1202	15	5 DRB1*1501/02/03/+	8	
6 DRB1*1202/07	6	6 DRB1*1501/02/04/+	9	
7 DRB1*1202/07/13	9	7 DRB1*1501/04/05/+	4	
8 DRB1*1202/07/13/+	1	8 DRB1*1502	7	
9 DRB1*1202/13	3	9 DRB1*1502/08/11/+	2	
10 DRB1*1202/13/15	2	10 DRB1*1502/08/14	1	
11 DRB1*120201	3	11 DRB1*1502/08/14/+	7	
12 DRB1*120201/0202/07	1	12 DRB1*1502/11/14	1	
13 HLA-DRB1*1202	2	13 DRB1*1502/11/14/+	2	
		14 DRB1*1502/14	1	
		15 DRB1*1502/14/19	2	
(以下右欄からの続き)		16 DRB1*1502/15	2	
19 HLA-DRB1*1502/11/+	1	17 DRB1*1502/19	2	
20 HLA-DRB1*1502/11/14	1	19 DRB1*150201	3	

Sample :H1902 (N=61)				
Allele:DRB1*110101				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 空欄	1	1 空欄	1	
2 DRB1*11	4	2 -	51	
3 DRB1*11/13/14	2	3 DRB1*03/04/11/+	2	
4 DRB1*1101	10	4 DRB1*0309/17/+	2	
5 DRB1*1101/02/+	1	5 DRB1*0412/15	1	
6 DRB1*1101/02/03/+	2	6 DRB1*1101/02/04/+	1	
7 DRB1*1101/02/04/+	2	7 DRB1*1101/05/12/+	1	
8 DRB1*1101/03	1	8 DRB1*110101/0106	1	
9 DRB1*1101/03/04/+	1	9 DRB1*1405/37/43/+	1	
10 DRB1*1101/04/05/+	2			
11 DRB1*1101/04/06/+	2	(以下左欄からの続き)		
12 DRB1*1101/04/12/+	1	20 DRB1*1101/27/37/+	1	
13 DRB1*1101/05/08/+	1	21 DRB1*1101/30	2	
14 DRB1*1101/05/11/+	3	22 DRB1*1101/37/39	3	
15 DRB1*1101/09/10/+	3	23 DRB1*1101/51	1	
16 DRB1*1101/12/15/+	8	24 DRB1*110101	2	
17 DRB1*1101/12/27/+	1	25 DRB1*110101/0106	1	
18 DRB1*1101/1346/+	2	26 HLA-DRB1*1101/05/+	1	
19 DRB1*1101/23/27/+	2	27 HLA-DRB1*1101/1307/+	1	

Sample :H1903 (N=61)				
Allele:DRB1*120201			Allele:DRB1*150201	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 空欄	1	1 空欄	1	
2 -	1	2 DRB1*15	4	
3 DRB1*12	4	3 DRB1*1501/02	1	
4 DRB1*1201/02/03/+	9	4 DRB1*1501/02/03/+	8	
5 DRB1*1201/02/06/+	2	5 DRB1*1501/02/04/+	11	
6 DRB1*1202	14	6 DRB1*1501/04/05/+	4	
7 DRB1*1202/07	7	7 DRB1*1502	7	
8 DRB1*1202/07/13	11	8 DRB1*1502/08/11/+	2	
9 DRB1*1202/07/13/+	1	9 DRB1*1502/08/14	1	
10 DRB1*1202/13	3	10 DRB1*1502/08/14/+	7	
11 DRB1*1202/13/15	2	11 DRB1*1502/11/14	1	
12 DRB1*120201	3	12 DRB1*1502/11/14/+	2	
13 DRB1*120201/0202/07	1	13 DRB1*1502/14	1	
14 HLA-DRB1*1202	2	14 DRB1*1502/14/19	2	
		15 DRB1*1502/15	2	
		16 DRB1*1502/19	2	
(以下右欄からの続き)		17 DRB1*150201	3	
19 HLA-DRB1*1502/11/14	1	18 HLA-DRB1*1502/11/+	1	

Sample :H1904 (N=61)				
Allele:DRB1*100101			Allele:DRB1*110601	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 空欄	1	1 空欄	1	
2 DRB1*10	4	2 DRB1*11	4	
3 DRB1*10/11	1	3 DRB1*1101/02/04/+	3	
4 DRB1*1001	46	4 DRB1*1101/03/04/+	1	
5 DRB1*1001/02	1	5 DRB1*1101/04/05/+	1	
6 DRB1*100101	6	6 DRB1*1101/04/06/+	4	
7 HLA-DRB1*1001	2	7 DRB1*1101/12/15/+	1	
		8 DRB1*1104/06/18/+	3	
		9 DRB1*1104/06/25/+	2	
		10 DRB1*1106	18	
		11 DRB1*1106/07	1	
		12 DRB1*1106/27	1	
		13 DRB1*1106/47	12	
		14 DRB1*110601	6	
		15 DRB1*110601/0602/47	1	
		16 HLA-DRB1*1106	2	

Sample :H1905 (N=61)				
Allele:DRB1*120201			Allele:DRB1*150201	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 空欄	7	1 空欄	7	
2 DRB1*1201/02/03/+	4	2 -	1	
3 DRB1*1201/02/06/+	3	3 DRB1*1501/02	2	
4 DRB1*1202	15	4 DRB1*1501/02/03/+	4	
5 DRB1*1202/03/15	1	5 DRB1*1501/02/04/+	9	
6 DRB1*1202/07	6	6 DRB1*1501/04/05/+	4	
7 DRB1*1202/07/13	10	7 DRB1*1502	6	
8 DRB1*1202/13	3	8 DRB1*1502/08/11/+	2	
9 DRB1*120201	2	9 DRB1*1502/08/14	1	
10 DRB1*120201/0202/07	1	10 DRB1*1502/08/14/+	5	
11 HLA-DRB1*1202	2	11 DRB1*1502/11/14	1	
12 N.T.	3	12 DRB1*1502/11/14/+	1	
13 undef	4	13 DRB1*1502/14	1	
		14 DRB1*1502/14/19	2	

Sample :H1906 (N=61)				
Allele:DRB1*140501			Allele:DRB1*150101	
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 空欄	7	1 空欄	7	
2 DRB1*11/14	1	2 -	1	
3 DRB1*1152/1405/+	4	3 DRB1*1501	8	
4 DRB1*1401/02/05/+	1	4 DRB1*1501/02	2	
5 DRB1*1402/03/05/+	1	5 DRB1*1501/02/03/+	2	
6 DRB1*1402/05/06/+	1	6 DRB1*1501/02/04/+	11	
7 DRB1*1405	9	7 DRB1*1501/03/04/+	4	
8 DRB1*1405/08	1	8 DRB1*1501/03/06/+	4	
9 DRB1*1405/08/14/+	2	9 DRB1*1501/04/05/+	5	
10 DRB1*1405/08/23/+	2	10 DRB1*1501/05	2	
11 DRB1*1405/08/45/+	1	11 DRB1*1501/06/07/+	1	
12 DRB1*1405/23	3	12 DRB1*1501/06/13/+	1	
13 DRB1*1405/23/37/+	1	13 DRB1*1501/13/16/+	1	
14 DRB1*1405/43	2	14 DRB1*1501/16/20/+	1	
22 N.T.	4	23 undef	4	

表 7 HLA-DRB3, 4, 5 および DPB1 ローカス表記の集計

Sample :H1901 (N=59)					Sample :H1902 (N=59)				
Allele:DRB3*0301		Allele:DRB5*0101			Allele:DRB3*0202				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 空欄	24	1 空欄	24		1 空欄	23	1 空欄	23	
2 DRB3*01/02/03	9	2 DRB5*01	2		2 DRB3*01/02/03	9	2 DRB3*01/02/03	34	
3 DRB3*0101/02/03/+	3	3 DRB5*01/02	9		3 DRB3*0101/02/03/+	3	3 DRB3*0101/02/03/+	1	
4 DRB3*02	1	4 DRB5*0101	5		4 DRB3*02	2	4 N.T.	1	
5 DRB3*03	1	5 DRB5*0101/02/03/+	3		5 DRB3*0201/02/03/+	12			
6 DRB3*0301	8	6 DRB5*0101/04/05/+	1		6 DRB3*0202	5			
7 DRB3*0301/03	12	7 DRB5*0101/05	3		7 DRB3*0202/03/05/+	1			
8 N.T.	1	8 DRB5*0101/05/06/+	10		8 DRB3*0202/10/11/+	3			
		9 DRB5*0102/03/08N	1		9 N.T.	1			
		10 N.T.	1						

Sample :H1903 (N=59)					Sample :H1904 (N=59)				
Allele:DRB3*0301		Allele:DRB5*0101			Allele:DRB3*0202				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 空欄	24	1 空欄	24		1 空欄	23	1 空欄	23	
2 DRB3*01/02/03	8	2 DRB5*01	2		2 DRB3*01/02/03	9	2 -	34	
3 DRB3*0101/02/03/+	3	3 DRB5*01/02	8		3 DRB3*0101/02/03/+	2	3 DRB1*11	1	
4 DRB3*02	1	4 DRB5*0101	4		4 DRB3*0107	1	4 DRB3*0101/02/03/+	1	
5 DRB3*03	1	5 DRB5*0101/02/03/+	3		5 DRB3*02	2	5		
6 DRB3*0301	8	6 DRB5*0101/04/05/+	1		6 DRB3*0201/02/03/+	11			
7 DRB3*0301/03	13	7 DRB5*0101/05	4		7 DRB3*0202	4			
8 N.T.	1	8 DRB5*0101/05/06/+	11		8 DRB3*0202/03/05/+	1			
		9 DRB5*0102/03/08N	1		9 DRB3*0202/03/06/+	1			
		10 N.T.	1		10 DRB3*0202/10/11/+	3			
					11 DRB3*0215	1			
					12 N.T.	1			

Sample :H1905 (N=59)					Sample :H1906 (N=59)				
Allele:DRB3*0301		Allele:DRB5*0101			Allele:DRB3*0202		Allele:DRB5*0101		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 空欄	29	1 空欄	29		1 空欄	29	1 空欄	29	
2 DRB3*01/02/03	2	2 DRB5*01	1		2 DRB3*01/02/03	1	2 DRB5*01	1	
3 DRB3*0101/02/03/+	1	3 DRB5*01/02	2		3 DRB3*02	1	3 DRB5*01/02	1	
4 DRB3*03	1	4 DRB5*0101	5		4 DRB3*0201/02/03/+	12	4 DRB5*0101	5	
5 DRB3*0301	8	5 DRB5*0101/02/03/+	1		5 DRB3*0202	5	5 DRB5*0101/02/03/+	1	
6 DRB3*0301/03	12	6 DRB5*0101/04/05/+	1		6 DRB3*0202/10/11/+	2	6 DRB5*0101/04/05/+	1	
7 N.T.	4	7 DRB5*0101/05	3		7 DRB3*0202/11/12/+	1	7 DRB5*0101/05	4	
8 undef	2	8 DRB5*0101/05/06/+	10		8 DRB3*0215	1	8 DRB5*0101/05/09/+	10	
		9 DRB5*0102/03/08/+	1		9 N.T.	5	9 N.T.	5	
		10 N.T.	4		10 undef	2	10 undef	2	
		11 undef	2						

Sample :H1901 (N=7)					Sample :H1902 (N=7)				
Allele:DPB1*0501		Allele:DPB1*1401			Allele:DPB1*1001				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 DPB1*0501	3	1 DPB1*1401	3		1 DPB1*1001	3	1 -	4	
2 HLA-DPB1*0501	1	2 HLA-DPB1*1401	1		2 HLA-DPB1*1001	1	2 N.T.	3	
3 N.T.	3	3 N.T.	3		3 N.T.	3			

Sample :H1903 (N=7)					Sample :H1904 (N=7)				
Allele:DPB1*0501		Allele:DPB1*1401			Allele:DPB1*0201		Allele:DPB1*1901		
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 DPB1*0501	3	1 DPB1*1401	3		1 DPB1*0201	1	1 -	1	
2 HLA-DPB1*0501	1	2 HLA-DPB1*1401	1		2 DPB1*020102	2	2 DPB1*0802/1901	1	
3 N.T.	3	3 N.T.	3		3 HLA-DPB1*0201//+	1	3 DPB1*1901	1	
					4 N.T.	3			

Sample :H1905 (N=7)					Sample :H1906 (N=7)				
Allele:DPB1*0501		Allele:DPB1*1401			Allele:DPB1*0501				
Local Assignment	件数	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数	Local Assignment	件数	
1 DPB1*0501	3	1 DPB1*1401	3		1 DPB1*0501	3	1 -	4	
2 HLA-DPB1*0501	1	2 HLA-DPB1*1401	1		2 HLA-DPB1*0501	1	2 N.T.	3	
3 N.T.	3	3 N.T.	3		3 N.T.	3			

表 8 HLA-DQA1, DQB1 ローカス表記の集計

Sample :H1901 (N=5)					
Allele:DQA1*0102			Allele:DQA1*0601		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*0101/02/04/+	1	1	DQA1*0601	2
2	DQA1*0102	1	2	N.T.	3
3	N.T.	3			

Sample :H1903 (N=5)					
Allele:DQA1*0102			Allele:DQA1*0601		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*0101/02/04/+	1	1	DQA1*0601	2
2	DQA1*0102	1	2	N.T.	3
3	N.T.	3			

Sample :H1905 (N=5)					
Allele:DQA1*0102			Allele:DQA1*0601		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*0101/02/04/+	1	1	DQA1*0601	1
2	N.T.	3	2	N.T.	3
3	undef	1	3	undef	1

Sample :H1901(N=26)					
Allele:DQB1*030101			Allele:DQB1*050201		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQB1*03	3	1	DQB1*05	4
2	DQB1*0301	6	2	DQB1*0501//02/03/+	1
3	DQB1*0301/04/09/+	6	3	DQB1*0501/02/03/+	5
4	DQB1*0301/09	4	4	DQB1*0502	9
5	DQB1*0301/09/13/+	2	5	DQB1*0502/05	3
6	DQB1*0301/16	1	6	DQB1*050201	2
7	DQB1*030101	2	7	HLA-DQB1*0502	1
8	HLA-DQB1*0301/09	1	8	N.T.	1
9	N.T.	1			

Sample :H1903 (N=25)					
Allele:DQB1*030101			Allele:DQB1*050201		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQB1*03	3	1	DQB1*05	4
2	DQB1*0301	6	2	DQB1*0501//02/03/+	1
3	DQB1*0301/04/09/+	5	3	DQB1*0501/02/03/+	4
4	DQB1*0301/09	4	4	DQB1*0502	9
5	DQB1*0301/09/13/+	2	5	DQB1*0502/05	3
6	DQB1*0301/16	1	6	DQB1*050201	2
7	DQB1*030101	2	7	HLA-DQB1*0502	1
8	HLA-DQB1*0301/09	1	8	N.T.	1
9	N.T.	1			

Sample :H1905 (N=19)					
Allele:DQB1*030101			Allele:DQB1*050201		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQB1*0301	4	1	DQB1*0501/02/03/+	2
2	DQB1*0301/04/09/+	2	2	DQB1*0502	7
3	DQB1*0301/09	3	3	DQB1*0502/05	1
4	DQB1*0301/09/13/+	1	4	DQB1*050201	1
5	DQB1*030101	1	5	HLA-DQB1*0502	1
6	HLA-DQB1*0301/09	1	6	N.T.	4
7	N.T.	4	7	undef	3
8	undef	3			

Sample :H1902 (N=5)					
Allele:DQA1*040101?			Allele:DQA1*05		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*040101	1	1	DQA1*040101	1
2	-	1	2	DQA1*0505/08	1
3	N.T.	3	3	N.T.	3

Sample :H1904 (N=5)					
Allele:DQA1*01			Allele:DQA1*05		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*0101/02/04/+	1	1	DQA1*0501/03/05	1
2	N.T.	3	2	N.T.	3
3	undef	1	3	undef	1

Sample :H1906 (N=5)					
Allele:DQA1*01					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQA1*0101/02/04/+	1	1	-	1
2	N.T.	3	2	N.T.	3
3	undef	1	3	undef	1

Sample :H1902 (N=26)					
Allele:DQB1*030101					
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQB1*03	3	1	-	23
2	DQB1*0301	5	2	DQB1*0301/04/09/+	1
3	DQB1*0301/04/09/+	6	3	undef	1
4	DQB1*0301/09	1	4	N.T.	1
5	DQB1*0301/09/13/+	7			
6	DQB1*030101	2			
7	HLA-DQB1*0301/09	1			
8	N.T.	1			

Sample :H1904 (N=26)					
Allele:DQB1*030101			Allele:DQB1*050101		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQB1*03	3	1	DQB1*05	4
2	DQB1*0301	6	2	DQB1*0501	12
3	DQB1*0301/04/09/+	6	3	DQB1*0501//02/03/+	1
4	DQB1*0301/09	4	4	DQB1*0501/02/03/+	5
5	DQB1*0301/09/13/+	3	5	DQB1*050101	2
6	DQB1*030101	2	6	N.T.	1
7	HLA-DQB1*0301/09	1			
8	N.T.	1			

Sample :H1906 (N=20)					
Allele:DQB1*050301			Allele:DQB1*060101		
	Local Assignment	件数		Local Assignment	件数
1	DQB1*0501/02/03/+	2	1	DQB1*0601	9
2	DQB1*0503	9	2	DQB1*0601/02/03/+	2
3	DQB1*050301	1	3	DQB1*060101	1
4	HLA-DQB1*0503	1	4	HLA-DQB1*0601	1
5	N.T.	4	5	N.T.	4
6	undef	3	6	undef	3

DRB1*12, DRB1*15 などの 2 桁による結果表記が数多く見られ、粗分別 (low resolution, 2 桁レベル) でのタイピングの結果表記だと思われるが、試薬の特性を知るためにも、区分できないアレルについて、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。

② “/” (スラッシュ) を用いた区分不可能なアレルの表記

例年のことであるが、“/” (スラッシュ) を用いた区分不可能なアレルの表記について、以下の間違いがあった。

- ・ 3 種類のアレルを表記し、最後に “/+” とするところを、4 種類以上のアレルによる結果表記 (例: B*4801/04/09/11)
- ・ 3 種類のアレルを表記し、最後に “/+” とするところを、1 種類または 2 種類のアレルの後に “/+” を付けた結果表記 (例: A*2402/+, A*2901/02/+, Cw*0801/04+, DRB1*1101/02/+)。
- ・ 3 種類のアレルを表記し、最後に “/+” とするところを、“+” だけで付けた結果表記 (例: B*4002/03/08+, B*5501/02/05+)

③ N (null) および L (low) の表記

null を意味する “N” および low expression を意味する “L” などを含めた結果表記 (例: A*2402/09N/11N/+, A*0101/03/04N/+) が多く見られたが、表記法ではこれらの記号を結果に表記しないこととされている。

④ 5 桁目以降の区分出来ないアレルの表記

表記法では、「5 桁以上の細分化が知られているアレルで、5 桁以上でアレルが特定できた場合にのみ、その桁数でアレルを記載する」とされており、5 桁目以降の区分出来ないアレル (例: Cw*150501/0502/0503, DRB1*120201/0202/07, DRB1*110101/0106) について、4 桁で表記する必要がある。

⑤ 判定不能、判定不可、判定保留および “nd” の表記

判定不能や判定不可の結果表記は、undefined の略

として undef と結果を表記し、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、undef の使用については、表記法で「判定されたアレルが一つで、それ以外に明らかに異なるアレルの存在が疑われるが、そのアレルが特定出来ない場合に、“nd” と記載しても良い」という “nd” の表記とは、使用用途が異なるため、使用する際には十分注意をすることが必要である。

⑥ 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が、2 施設で同じアレルが入力され、3 施設で後ろのカラムが空欄であった。

2.2. HLA 型の表記の問題点

HLA 型 (HLA 抗原型) 表記の基本的な問題として、ローカス名が記載されていない施設が 21 施設あった。また、DNA タイピング結果は入力されているが、HLA 型が表記されていない施設が 2 施設、HLA 型にアレルを意味するアスタリスク “*” を付記していた施設が、1 施設あった。

HLA-A ローカスの HLA 型表記では、A*2403 に対応する HLA 型が公認抗原である A2403 であることから、A24 でなく A2403 と表記する必要がある。

HLA-B ローカスの HLA 型表記では、B40 および B15 抗原群のアレルと HLA 型の関係は複雑である。今回の QCWS では、B*1513 とタイピングされた場合の HLA 型は B77 であるが、2 施設で HLA 型を B15 と表記しており、B15 抗原群でのアレルと HLA 型の対応を習熟する必要がある。

HLA-DRB3, DRB4, DRB5 ローカスに対応するそれぞれの HLA 型は、HLA-DR52, DR53, DR51 であり、アレル名または遺伝子座名で HLA 型を表記はしない (例: DRB3 3, DRB5 1, DRB3, DRB5 等)。

HLA-DQB1 ローカスの HLA 型の表記として、DQB1*03 を DQ7 としていたが、DQ7 は DQB1*0301 とタイプされた場合だけで、DQB1*03 に対応する HLA 型は DQ3 が適切である。

第11回 HLA-QC ワークショップレポート（抗体部門） —企画と実施内容・総合解析—

中島文明(日本赤十字社中央血液研究所), 赤座達也(特定非営利活動法人 HLA 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

1. はじめに

本ワークショップ抗体部門の目的は DNA 部門と基本的に同じである。それは、検査方法の理解と普及であり、各参加者は技術と知識の向上を目指す。そして、自施設の結果を全体の結果と比較し、改善していく。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抗体部門は、ワークショップを通じて、各施設における結果の整合性を維持し、標準化を目指すことにある。

平成 17 年から始まった抗体部門は今回が三回目であり、実施上で幾つかの改善を試みた。また、解析においてはエピトープを推定する解析ソフトを用いて、より客観的な解析を可能とした。

2. 企画と実施内容

2.1. 実施経過

本年はワークショップ集会が例年より 1 ヶ月ほど早目の開催であったため、スケジュールもそれを見越して計画され、概ねそのとおり実行できた。同意書の収集に手間取ったが、改善可能な部分である。(表 1)

表 1 実施経過

平成19年1月	日赤血液センターに抗血清譲渡依頼
平成19年2月24日	参加申込み締切り
平成19年3月～	サンプルの選定・抗体反応性確認・分注
平成19年4月5日	同意書送付
平成19年5月7日	抗体QCサンプル配布
平成19年5月17日	データ入力シート配布
平成19年6月10日	データ提出締切り
平成19年6月～	抗体QCデータ解析・発表者選定
平成19年8月8日	全データ・集計データ送付
平成19年9月9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年までの市販抗血清から、血液センターへの譲渡依頼で提供できるようにした。これにより、選択範囲が格段に広がり、すでにある LCT 法のデータを参考に精製抗原試薬で確認し、その中から 4 本を選択した。参加施設に 1ml ずつ配布し、同時に昨年と同じく、取扱いに関する誓約書の返送を義務付けた。これらの選択基準と内容は別表に示す。(表 2)

2.3. データ収集

データの収集は Microsoft Excel で作成した統一形式の入力ファイルを配布した。今回から、方法別であったファイルの一つにまとめ、メニュー形式で入力可能とした。追加される画像データファイル、測定データファイルなども事務局での混乱を防ぐため、ファイル名の付け方を一定のルールで統一して収集した。

2.4. 参加施設と検査方法別集計

参加施設は例年約一割ずつ減少しているが、血液センターが徐々に減っていることが原因である。(表 3) 方法別では、LCT と MPHA が減少した。血液センターの参加が減った影響である。精製抗原各法では Single antigen 試薬（以下、SA）が増加し、また、新たに国産試薬が加わった。(表 4)

2.5. 解析

収集したデータは事務局で一旦まとめ、各施設に再配布した。各解析担当者は、これまでの人選から可能な限り一新し、新たな視点での解析を目指した。

3. 総合解析

ここでは、全体的な総合解析について述べるこ

表2 配布した HLA 抗体サンプルと選定理由

サンプルID	カラーコード	抗体力価 (LCT法)	抗体特異性 (LCT法)	抗体性状	選別理由
SH1901	red	x1	A3 A11 A32 A74	HLAクラスI-IgG? HLAクラスI-IgM	エピトープ解析用
SH1902	blue	x8~32	B18 B35 B37 B51 B5102 B52 B53	HLAクラスI-IgG	エピトープ解析用
SH1903	yellow	不明	A32 Bw4 B46 Cw9 Cw10	HLAクラスI-IgG HLAクラスI-IgM? HLAクラスII-IgG?	患者サンプルを想定
SH1904	green	x1	Cw1	HLAクラスI-IgG HLAクラスII-IgG HLAクラスII-IgM?	Cローカス抗体の検出 を方法別に確認

1. 明確な抗体特異性を有するIgM抗体 → SH1901
2. 明確な抗体特異性を有するIgG抗体 → SH1902
3. 広範囲に抗体特異性を有するサンプル → SH1903
4. Cローカス抗原に対する抗体 → SH1903/1904
5. HLAクラスII抗原に対する抗体 → SH1904

血液センター保管の抗血清から譲渡を受け、これら4検体を1mlずつ配布。

表3 参加施設と内訳(これまでの比較)

	9th.QCWS (2005)		10th.QCWS (2006)		11th.QCWS (2007)	
	n	%	n	%	n	%
血液センター	17	35.4%	16	37.2%	12	30.0%
大学病院	12	25.0%	11	25.6%	12	30.0%
検査・輸血部	11	22.9%	9	20.9%	8	20.0%
検査センター	4	8.3%	3	7.0%	5	12.5%
研究施設	2	4.2%	3	7.0%	2	5.0%
その他	2	4.2%	1	2.3%	1	2.5%
(Total)	48		43		40	
データ提出	44	91.7%	39	90.7%	37	92.5%

とする。

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。SH1901 と 1902 は抗体特異性が明確で、エピトープ解析用として選択した。それぞれ対照的に前者が IgM 抗体、後者が IgG 抗体である。そのため、SH1901 は方法に依存し、検出率は 4 割程度であった。クラス II 抗体はどれも微弱で SH1901 と 1904 でかろうじて検出できていた。方法別では二次抗体に IgM を使用しない場合は SH1901 が全く検出できない。逆に IgG を使用しない場合は SH1902 が検出できない。そのような中、AHG-LCT 法のクラ

ス I は 100%検出できている。(表 5)

3.2. HLA 抗体の特異性解析

3.2.1. SH1901

LABScreen (PRA; 1 施設, SA; 2 施設)の蛍光値を抗体特異性に比較すると、①A3+A11+A32+A74 が 12,000~9,000 前後、②A1+A36 が 5,000~2,000 前後、③A25 が 1,400 程度で、少なくともこれら 3 種の抗体特異性を含んでいると考えられる。この情報をもとにエピトープ解析をすると、①は 67 番目アミノ酸がバリリン (V) に置換しているときの特異性が A3+A11+A32+A74、②は 62~63 番目アミノ酸がグルタミン・セリン (QE) に置換しているときの特異

表4 参加施設の検査方法別一覧(前回との比較)

			10th.QCWS (2006)				11th.QCWS (2007)			
総合判定提出 / データ提出施設数			24/39				37/37			
方 法			クラスⅠ		クラスⅡ		クラスⅠ		クラスⅡ	
LCT			16 (584)		4 (47)		11 (388)		2 (6)	
AHG-LCT			14 (576)				10 (345)			
方 法	パネル形態		クラスⅠ				クラスⅠ			
			IgG		IgM		IgG		IgM	
MPHA	オリビオ(スクリーニング用)		7				5			
	anti HPAパネル		5				6		1	
	自家製パネル		1 (8)				1 (4)			
PAKPLUS			3		1		3			
方 法	パネル形態	抗原 グループ	クラスⅠ	クラスⅡ	クラスⅠ	クラスⅡ	クラスⅠ	クラスⅡ	クラスⅠ	クラスⅡ
			IgG		IgM		IgG		IgM	
LAT	Mixed		3				2			
	LAT		1				1			
FlowPRA	Screening		24	20	8	4	22	19	7	6
	Specific		2				1			
	Single antigen	1-4	6	5			8	5		
		5-10	3					4		
LABScreen	Mixed		5		1		4		1	
	PRA		8	6	2	2	7	7	1	1
		1 (4)	7	5	2	1	9	7	2	2
		2 (4)	6	2		8		2		
		3 (4)	3			7		2		
LIFT		2 (93)				3(345)				
WAKFlow	PRA						6			

数字は参加施設数, ()内の数字は反応させたパネル数

表5 施設別抗体検出率(有無)

Lab ID	2次 抗体	検査方法	ClassI					ClassII				
			SH1901	SH1902	SH1903	SH1904	施設数	SH1901	SH1902	SH1903	SH1904	施設数
検査方法別 (施設単位)		LCT	91%	82%	91%	100%	11	50%	100%	50%	100%	2
		AHG	100%	100%	100%	100%	10					
		LIFT	100%	100%	100%	100%	1					
	IgG	MPHA	0%	71%	100%	71%	7					
		PACPLUS	0%	100%	100%	100%	3					
		LIFT	100%	100%	100%	100%	2					
		LAT	0%	50%	100%	50%	2					
		FlowPRA	13%	87%	100%	96%	23	11%	0%	0%	0%	19
		LABScreen	18%	100%	100%	100%	11	80%	0%	10%	50%	10
	IgM	MPHA	0%	0%	0%	0%	1					
		LIFT	100%	0%	0%	0%	2					
		FlowPRA	100%	0%	100%	60%	5	0%	0%	0%	33%	3
		LABScreen	100%	0%	100%	100%	2	0%	0%	0%	50%	2
	2次抗体別 (方法累計)	IgG	13%	88%	100%	92%	32	33%	0%	3%	17%	25
	IgM	90%	0%	78%	56%	7	0%	0%	0%	40%	4	
総合判定			43%	92%	97%	95%	37	41%	7%	7%	26%	27

性がA3+A11+A32+A74+A1+A36, ③は76~77番
目アミノ酸がグルタミン酸・セリン(ES)に置換し
ているときの特異性がA25+A32であり, 3種の抗体
の複合であることが推定された。このうち, LCT法
で検出できるのは①の部分だけである。

3.2.2. SH1902

LABScreen (PRA; 6施設, SA; 7施設)の蛍光値
を抗体特異性別に比較すると, B51+B35+B53がSA
で9,000前後であったが, その他の特異性やPRAの
結果では明確なクラスターが認められなかった。全

体的な特異性である B51+B35+B53+B78+B18+B37+B52+B58 をもとにエピトープ解析すると、45 番目アミノ酸がトレオニン (T) に置換した場合この特異性に一致することが認められた。これはベータ・シート上のアミノ酸で、結合したペプチドの影響で反応が認められるものと考えられる。これ以外に 67 番目アミノ酸がフェニルアラニン (F) に置換した時の特異性である B51+B35+B53+B78 との相乗効果が推測され、この部分が SA で高い蛍光値を示したのであろう。実際に 67 番目アミノ酸にフェニルアラニンを持たない B52 や B37 では、LCT 法の反応は非常に弱い。

3.2.3. SH1903

抗体特異性が広範囲におよぶサンプルである。LCT 法では、A9 を含む Bw4 の特異性に Cw3 が隠れている。しかし、精製抗原試薬では非常に多くの特異性を示す。この場合、抗体特異性とは逆に、反応しない抗原解析、すなわち許容抗原を調べた。A ローカスは A2, A10, A19, B ローカスは B40 関連と B7 関連, C ローカスは Cw4 と Cw7 であり、これら以外の抗原とは反応している。また、これらの許容抗原の中に、本抗体保有者の HLA 型が存在するともいえる。

3.2.4. SH1904

LCT 法で Cw1 単独特異性を示すサンプルである。精製抗原試薬では、B22 関連のほか多数の抗体特異性を示し、C ローカスも Cw1 以外の多くと反応している。ただし、A ローカス特異性は認めない。やはり、血小板を材料とした MPFA 法や PAKPLUS は反応が弱い。以外にも、LIFT や PRA タイプの精製抗原試薬では、Cw1 との反応がさほど強くない。しかし、SA では、LCT 法と同じく強陽性を示した。これは、パネル形態上の抗原分子量の差を忠実に反映した結果と考えられる。LCT 法は、一旦細胞傷害が進行すると、抗原分子量に関係なく強陽性を示している。このサンプルは、各検査方法の特徴を端的に観察することができた。(表 6)

4. まとめ

これまで三回の抗体 QC ワークショップを行ってきて各検査方法の特徴、HLA 抗体そのものの性状が

表 6 検査方法別の HLA 抗体特異性比較

SH1901: Class I (IgM)									
LCT	A3	A11	A32						
AHG—LCT	A3	A11	A32	-	-	-	-	-	-
MPHA(M)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIFT(M)	A3	A11	-	-	-	-	-	-	-
FlowPRA(M)	A3	A11	A32	A74	A66	A1	A36	A25	
LABScreen(M)	A3	A11	A32	A74	A66	A1	A36	A25	

SH1902: Class I (IgG)									
LCT	B35	B51	B52	-	-	-			
AHG—LCT	B35	B51	B52	B37	-	-	-		
MPHA(G)	B35	B51	-	-	-	-			
LIFT(G)	B35	B51	B52	B37	-	-	-		
LAT(G)	B35	B51	B52	B37	B18	B53	B78		
FlowPRA(G)	B35	B51	B52	B37	B18	B53	B78		
LABScreen(G)	B35	B51	B52	B37	B18	B53	B78	B58	

SH1903: Class I (IgG)									
LCT	A24	B4	B46	Cw9	Cw10				
AHG—LCT	A24	B4	B46	Cw9	Cw10				
MPHA(G)	A24	B4	-	Cw9	Cw10				
LIFT(G)	A24	B4	B46	Cw9	Cw10				
LAT(G)	A24	B4	B46	-	-			他ABCw多数	
FlowPRA(G)	A24	B4	B46	Cw9	Cw10			他ABCw多数	
LABScreen(G)	A24	B4	B46	Cw9	Cw10			他ABCw多数	

SH1904: Class I (IgG)									
LCT	Cw1	B56	B55						
AHG—LCT	Cw1	B56	B55						
MPHA(G)	Cw1								
LIFT(G)	Cw1	B56						他BCw多数	
FlowPRA(G)	Cw1	B56	B55	B54	B59			他BCw多数	
LABScreen(G)	Cw1	B56	B55	B54	B59			他BCw多数	

(G) 2次抗体IgG (M) 2次抗体IgM  強陽性反応

かなり明確になってきた。検査方法に関しては、量的な感度差として、単純に感度の違いで拾える抗体特異性に違いがあること。質的な感度差として、方法論に依存した、例えば細胞傷害と二次抗体の種類、パネルの形態による違いがあることが確認できた。また、HLA 抗体の性状では、一つのサンプルの抗体特異性はほとんどの場合複数存在すること、それらの多くはローカスを超えて共通のエピトープを認識していること、さらに、免疫グロブリン・サブタイプの違いで明確に特異性を分類できることなどが判明してきた。

今後は、このような知見のもとにワークショップを進め、検査方法の違いや施設間で結果に整合性が保たれる機能を持たせたい。例えば、抗体検出に限っても、すべての施設が同一の結果になるべきところが、現在のところ 100% 一致していない。100% 一致していないということは、施設によって臨床側などが受け取る報告に差があることを証明している。このような状況を具体的に打開していくに

は、詳細な手技や機器設定について検査方法別グループでの討議を取り入れる、あるいは必要であれば

テクニカル・ワークショップなども視野に入れ検討していきたい。

第11回 HLA-QC ワークショップレポート（抗体部門） —LCT・AHG-LCT 法—

寺木 佳子(千葉県赤十字血液センター 検査二課), 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

1. 概要

今回のワークショップにおいてLCTおよびAHG-LCT法での参加施設は、クラスⅠが11施設、クラスⅡが2施設であった。提出されたパネル細胞は、クラスⅠが388パネル、クラスⅡが6パネルであった。表1に示したように、前回ワークショップと比

較すると参加施設数、提出パネル数とも約30%少なくなっていた。

各施設から提出されたクラスⅠ抗体判定結果の概要を表2に示した。

LCT法において、SH1901、SH1902、SH1903はいずれも1施設を除き抗体陽性と判定された。

表1 参加施設数、提出パネル数

	第11回 HLA・QCWS		第10回 HLA・QCWS	
	参加施設数	提出パネル数	参加施設数	提出パネル数
LCT法 クラスⅠ	11	388	16	584
LCT法 クラスⅡ	2	6	4	47
AHG-LCT法	10	345	14	576

表2 報告さ

サンプルID	LCT法 (11施設)	AHG-LCT法 (10施設)	抗体特異性
SH1901	陽性: 10 陰性: 1	陽性: 9 未検査: 1	A11 A3 A32
SH1902	陽性: 10 陰性: 1	陽性: 10 陰性: 0	B51 B35 B5102 B52 B37
SH1903	陽性: 10 陰性: 1	陽性: 10 陰性: 0	Cw9 Cw10 B46 Bw4 (B51 B52 B5102 B44 B59 B37 B38 B27 B13)
SH1904	陽性: 11 陰性: 0	陽性: 10 陰性: 0	Cw1 B54 B55 B67

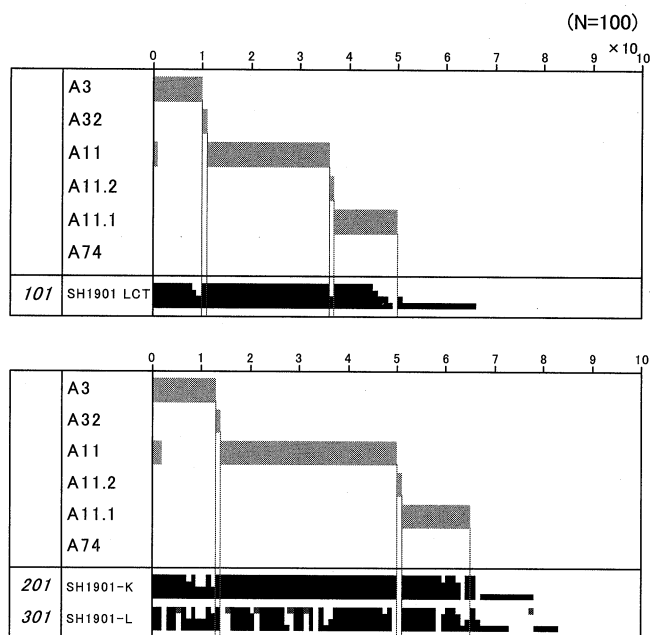


図1 SH1901 セログラフ

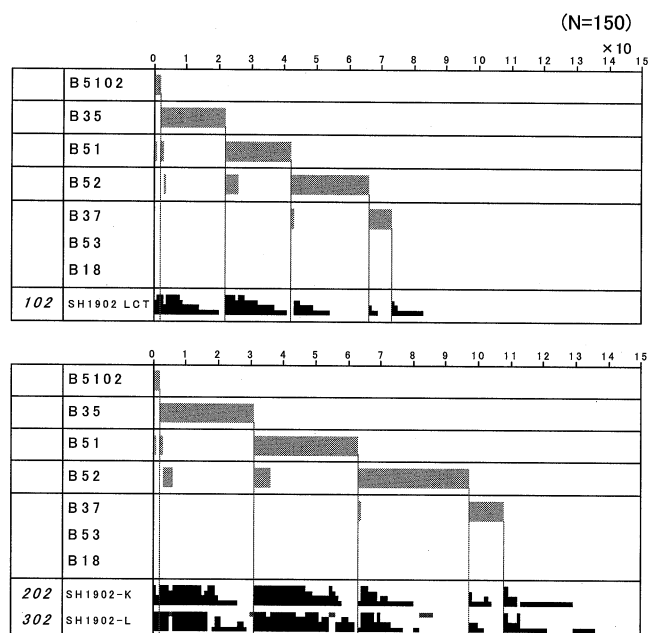


図2 SH1902 セログラフ

SH1904 は全施設が陽性と判定していた。

AHG-LCT 法では、全てのサンプルとも全施設で抗体を検出していた。

なお、クラス II 抗体については提出パネルがわずか 6 パネルと大変少なかったため、今回は解析を行うことができなかった。

2. 解析

各サンプルの反応性について、提出されたデータを用いてセログラフを作成し解析を行った。

SH1901: LCT 法, AHG-LCT 法とも A3, A32, A11 抗原に対する反応が認められた。AHG-LCT 法では LCT 法で一部反応の弱かった A11 パネルとも良好な反応を示した。QC ワークショップ部会で事前に確認されていた A74 抗原に対する反応は、今回パネルの提出がなかったため検出されなかった。(図 1)

SH1902: LCT 法で B35, B51, B5102, B52 抗原と弱い反応を認めた。AHG-LCT 法では B35, B51 は LCT 法に比べ反応が強くなったが、B52 パネルの反応性は LCT 法と同様であった。また、AHG-LCT 法では、B37 パネルとも弱い反応が認められた。SH1902 でも事前に確認されていた B18, B53 抗原

に対する反応は、パネルの提出がなかったため検出されなかった。(図 2)

SH1903: SH1903 と SH1904 は C ローカス抗原に対する反応を含むサンプルであった。いくつかの施設で、C ローカスのタイプ未記入のパネルデータがあったが、こうしたパネルでは陽性反応全てが A, B ローカス抗原に対する反応とされてしまうため、SH1903 及び SH1904 の解析からは除外した。

SH1903 は LCT 法で Cw9, Cw10, Cw3, B46 さらに B51, B52 抗原と良好な反応を示し、B44 抗原とも弱い反応を認めた。AHG-LCT 法では全パネルの約 90% が陽性となる広範囲な反応を示した。LCT 法で認められた特異性に加え Bw4 グループの B ローカス抗原 B37, B38, B59 と強く、B13, B27 とは弱く反応を示した。さらに B35, B62, B55, B56, B67, B48 抗原とも反応が認められた。データ提出のあった他の B ローカス抗原をセログラフに加えたところ、B39, B60, B61 抗原とは反応が認められなかった。(図 3, 4, 5)

SH1904: SH1904 は LCT 法で Cw1 抗原と強く、B55, B56 抗原と弱く反応を認めた。AHG-LCT 法では B55, B56 抗原との反応が強くなり B67 抗原とも反応を認めた。(図 6)

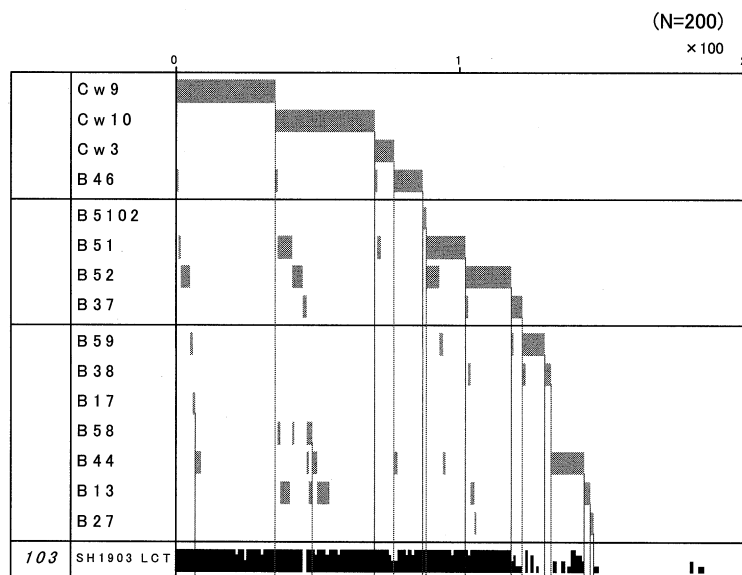


図3 SH1903 LCT セログラフ

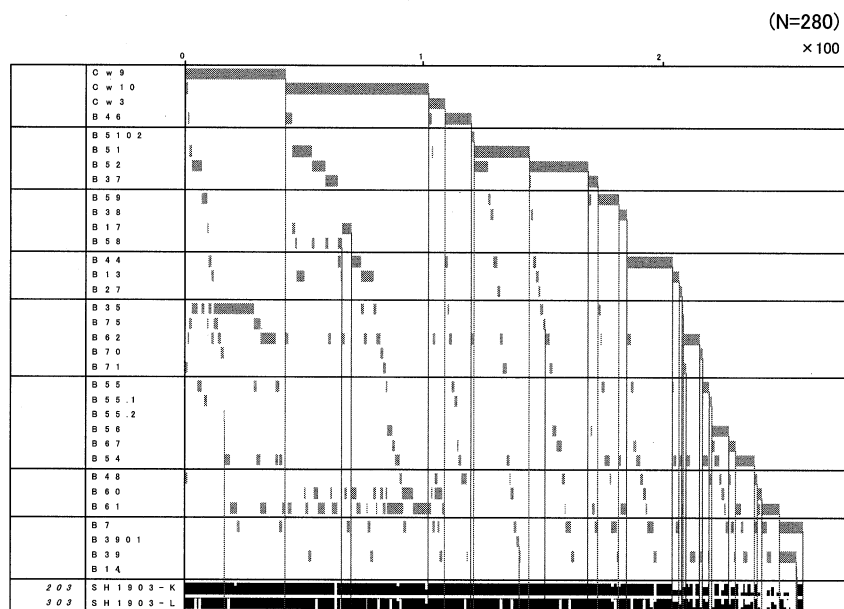


図4 SH1903 AHG-LCT セログラフ

3. まとめ

今回の解析から、提出パネルのタイピングデータ表記(特にCローカス)に統一が必要であると考えられた。また、LCT法は他方法に比べ感度が低いとされているが、今回のサンプルSH1904におけるCw1

抗原に対する反応は、精製抗原を用いた高感度法 (Single Antigen) と同様大変良好であり LCT 法での検査が有効であるケースもあることが示された。(図7)

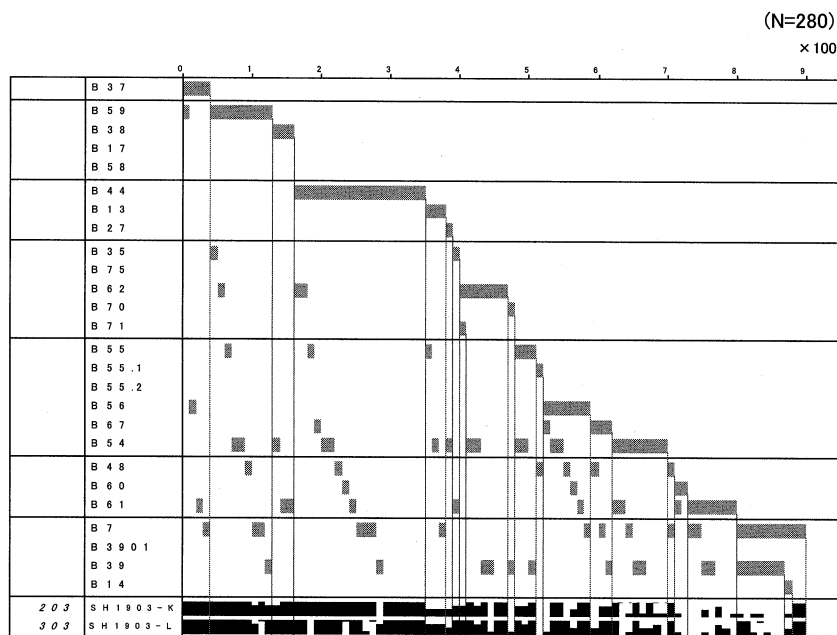


図 5 SH1903 AHG-LCT セログラフ

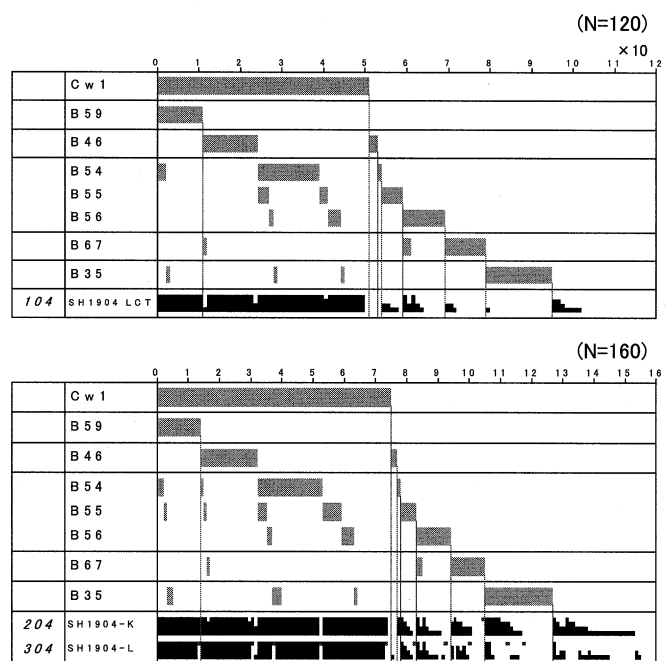


図 6 SH1904 セログラフ

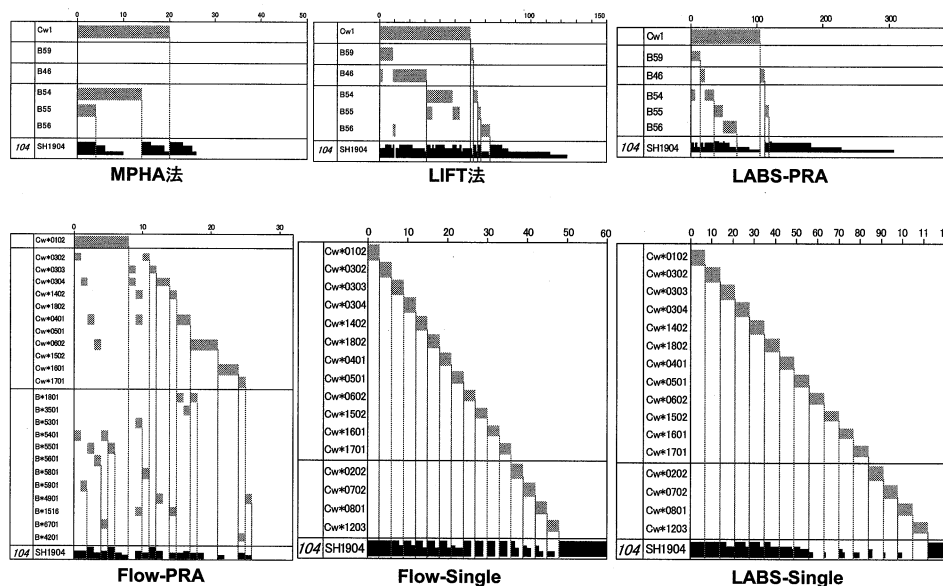


図7 他方法との比較 ～SH1904～

第11回 HLA-QC ワークショップレポート（抗体部門） —方法論別検討（LIFT 法）—

平田康司（岡山県赤十字血液センター検査課），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

LIFT 法は，リンパ球抗原とサンプル抗体の反応性を蛍光標識二次抗体で検出する方法で，フローサイトメーターを用い測定される。

本年度は，下に示す概要のとおり，3 施設より LIFT 法のデータが提出されており，測定はクラス I 抗体の検出のみであった。この3 施設のうち，2 施設は抗体の検出および特異性同定を，1 施設は（他法で示された抗体特異性の）抗原反応性の確認として LIFT 法が行われたようである。二次抗体はいずれの施設でも IgG および IgM 抗体の検出が可能であり，そのうち1 施設では IgG, IgM それぞれの抗体特異性の同定が行われていた。表1 および表2 に3 施設より報告されたそれぞれのサンプルの抗体特異性および LIFT 法による抗体特異性を示した。今回 LIFT

法は，Flow-PRA や LABScreen のような高感度検査に近い抗体特異性が示されていた。しかしながら，LIFT 法はパネル細胞を用いるため，サンプル 1903 および 1904 のように，複数の抗体特異性を示すものや異なるローカスにおいて反応性がみられるものの場合，多くの種類のパネル細胞を必要とし，使用するパネル細胞の HLA 型を十分考慮しなければならない。一方，精製抗原試薬とは異なり LIFT 法は生体材料を抗原としているので，生体における抗体反応性により近い現象を捉えられていることが推測される。今後，操作方法の統一および精度管理について検討し，本方法の臨床的妥当性についてデータの蓄積がされることが望まれる。

表1 報告されたサンプルの抗体特性

施設	サンプルID		IgG		
	HLA	SH1901	SH1902	SH1903	SH1904
19S003	陽性抗原	A11(11.1)	non	A24	non
	A 陰性抗原	※	A2, 3, 11, 24, 26, 30, 31, 33	A2, 11	※
	保留	non	A1	A1, 3, 26, 30, 31, 33	non
	陽性抗原	non	B35, 37, 51, 52	Bw4(27, 38, 51, 52, 59), 35, 46, 56, 62, 71	B13, 35, 51, 54, 55, 56, 59, 67
	B 陰性抗原	※	※	B7, 39, 48, 54, 55, 60, 61, 67	B7, 27, 37, 38, 39, 44, 48, 52, 60, 61, 62, 71, 75
	保留	non	non	B13, 37, 44, 58, 75	B46, 58
	陽性抗原	non	non	Cw9, 10	Cw1
19S027 (G+M)	陰性抗原	※	※	Cw1, 7	Cw4, 6, 7, 9, 10
	保留	non	non	Cw4, 6, 8	non
	陽性抗原	A11	non		non
	A 陰性抗原	※	※		※
	保留	A30	A1	all	A3, A30, A33
	陽性抗原	non	B35, 51, 52		non
	B 陰性抗原	※	※		※
19S032	保留	non	B13, 27, B37, 56, 71	all	B13, 35, 38, 39, 44, 46, 54, 55, 56, 59, 67, 71
	陽性抗原	non	non		Cw1
	陰性抗原	※	※		※
	保留	Cw6	non	all	Cw6
	陽性抗原	non	non		non
	A 陰性抗原	A2	A2		A26, 33
	保留	A24, 26, 31			A2, 11, 24, 31
19S032	陽性抗原	non	non		non
	B 陰性抗原	B61			B39, 44
	保留	B35, 51, 52			B35, 46, 48, 52, 61, 67
	陽性抗原	non			※
	陰性抗原	Cw8, 10			Cw7
	保留	※			※
	抗体特異性 (consensus)	A11(w)	B35, B37(w), B51, B52(w)	A24+Bw4(B27, 38, 51, 52, 59), 35, 46, 56, 62, 70(71)+Cw9,10	Cw1 (+B13, 35, 54, 55, 56, 59, 67) *
コメント				* Cw抗原の反応性が寄与している可能性有り	

※: 省略

表 2 LIFT 法による抗体特異性

施設	サンプルID		IgM			
	HLA		SH1901	SH1902	SH1903	SH1904
19S003	A	陽性抗原	A3, 11(11.1,11.2)	non	non	non
		陰性抗原	※	※	※	※
		保留	non	non	non	non
	B	陽性抗原	non	non	non	non
		陰性抗原	※	※	※	※
		保留	non	non	non	non
	Cw	陽性抗原	non	non	non	non
		陰性抗原	※	※	※	※
		保留	non	non	non	non
19S027 (G+M)	A	陽性抗原				
		陰性抗原				
		保留				
	B	陽性抗原				
		陰性抗原				
		保留				
	Cw	陽性抗原				
		陰性抗原				
		保留				
19S032	A	陽性抗原	non			
		陰性抗原	A26			
		保留	A1, 3, 11, 24, 31			
	B	陽性抗原	non			
		陰性抗原	B44			
		保留	B7, 13, 27, 37, 54, 60, 61			
	Cw	陽性抗原	non			
		陰性抗原	Cw9			
		保留	Cw1, 4, 6, 7, 10, 12			
抗体特異性 (consensus)		A3, 11				
コメント						

※: 省略

(1) 実施施設: 3 施設(19S003, 19S0027, 19S032*
クラス I 抗体のみ

(2) 各施設における LIFT 法

19S003 (G+M 同一系), 2 次抗体 IgG (PE, Jack-
son), IgM (FITC, Jackson), 196 パネル

19S027 (G+M 同一系), 2 次抗体 IgG (FITC,
Beckman Coulter), IgM (FITC, KPL), 131 パネル
19S032 (G, M 選択系), 2 次抗体 IgG (FITC,
DAKO), IgM (FITC, DAKO), 18 パネル

サンプル別 パネル数

	19S003		19S027		19S032	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
SH1901	91	87	73		8	
SH1902	93		49		4	
SH1903	121		57			
SH1904	136		65		6	

第11回 HLA-QC ワークショップレポート（抗体部門） —MPHA/PAKPLUS/LAT 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

1. はじめに

市販試薬である MPHA 法キット—オリビオ II 及びパネル：オリンパス社—(以下 MPHA) と PAKPLUS: GTI 社は血小板抗体検出法であるが、同時に HLA 抗体の検出も可能である。測定原理には、MPHA が混合受身凝集法を、PAKPLUS は酵素免疫測定法 (ELISA 法) を使用している。

また、LAT: One Lambda 社は HLA 抗体検出用の市販試薬であり、測定原理は ELISA 法である。

そこで、今回は MPHA と ELISA に分け、測定原理別に解析を行った。

2. MPHA

MPHA は 8 施設(オリビオ II: 5 施設; パネル: 6 施設)で実施された。(表 1)

血清 SH1902 と SH1904 の結果に違いが見られたので、その 2 種類の検体に関して解析を行った。

表 1 MPHA 参加施設と判定結果

No.	Lab.	SH1901	SH1902	SH1903	SH1904	オリビオ	パネル
1	19S036	1	8	8	8	60913	
2	19S012	1	1	8	1	61023	60902
3	19S032	1	8	8	1	61023	
4	19S039	1	8	8	8	61023	61218
5	19S019	1	8	8	8	70205	61218
6	19S028	1	1	8	8		60902
7	19S038	1	8	8	8		61218
8	19S005	1	8	8	8		61218

表2 MPHA-オリビオ II 判定結果

Lab.	SH1902	SH1904	Lot.No
19S036	6	2	60913
19S012	6	2	61023
19S032	6	1	61023
19S039	6	6	61023
19S019	8	1	70205

Lot. No.	HLA type					
	A		B		Cw	
60913	24	33	44	52	12	14
	11	-	7	39	7	-
	2	11	62	71	4	8
61023	24	31	52	59	1	-
	2	11	13	62	1	7
	2	24	35	58	8	10
70205	24	31	51	54	1	14
	24	-	7	39	7	-
	31	33	44	51	14	-

1) SH1902-特異性：B18, B35, B37, B51, B5102, B52, B53 (表2, 表3)

オリビオ II では全ての施設において陽性と判定しており、全ロットのプレートにB5 関連の抗原がコートされてあった。

しかし、パネルプレートでは2施設が陰性判定をしていた。これは、陰性判定をした施設はLot.60802を使用しており、このプレートにはB52しかコートされていなかったためである。B53やB51と比較してB52に反応する抗体の反応性が弱く、Lot.61218のプレートでもB52をコートしたウェルは陰性となっている。

2) SH1903-特異性：Cw1 (表2, 表3)

MPHAでは、Cw1に対する抗体を検出することは出来なかった。

オリビオ II・パネルいずれもCw1抗原をコートしているが、オリビオ II に関しては1施設のみ陽性反応を示した。パネルプレートに関しては反応しているウェルとそうでないウェルが存在し、これは

Cw1以外の抗原に対する反応であると思われる。

市販MPHAは血小板抗体検出用の試薬であり、オリビオ II は3種類のパネル由来の抗原が混在するスクリーニング用キット、パネルはオリビオ II とは異なる8パネルがそれぞれ8個のウェルにコーティングされている同定用キットである。しかし、これは血小板抗体用であるため、他のHLA抗体検出試薬のように「Screening 試薬が陽性であっても、同定試薬のパネルで陰性であったら陰性」という判定には出来ない。

また、MPHAに関しても他の試薬と同様にCローカスの抗原に対する抗体の検出率は良くなかった。

3. ELISA 法

測定原理としてELISA法を使用している市販試薬はPAKPLUSとLATである。今回PAKPLUSは3施設、LAT (LAT-Mixed: 2施設; LAT-1HD: 1施設)は2施設で行われた。LAT-Mixedはスクリーニング試薬で、LAT-1HDは1ウェルに1抗原がコーティングされている同定用試薬である。LATに関し

表3 MPHA-パネル判定結果

Lot	No	使用抗原	HLA						SH1902				SH1904			
			A(1)	A(2)	B(1)	B(2)	Cw(1)	Cw(2)	S005	S019	S038	S039	S005	S019	S038	S039
61218	1	A	24	33	44	51	14	—	8	8	8	8	1	1	1	1
	2	B	24	31	52	61	10	12	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	C	11	33	62	—	1	4	1	1	2	1	8	6	8	6
	4	D	24	26	54	55	1	—	1	1	2	1	8	8	8	8
	5	E	11	33	48	51	8	14	8	8	8	8	1	1	1	1
	6	F	2	—	35	61	9	10	8	8	8	8	1	1	2	1
	7	G	2	24	54	61	1	8	1	1	1	1	2	1	6	1
	8	H	2	26	62	67	7	—	1	1	1	1	8	6	8	8

Lot	No	使用抗原	HLA						SH1902		SH1904	
			A(1)	A(2)	B(1)	B(2)	Cw(1)	Cw(2)	S012	S028	S012	S028
60802	1	A	24	31	60	—	4	10	1	2	1	1
	2	B	24	31	52	61	10	12	1	2	1	6
	3	C	11	33	62	—	1	4	1	2	2	6
	4	D	2	24	54	52	1	12	1	2	2	2
	5	E	31	33	58	62	4	10	1	2	1	1
	6	F	26	—	39	54	1	7	1	2	2	6
	7	G	2	24	54	62	1	8	1	2	1	1
	8	H	2	—	39	—	7	—	1	1	1	1

ては判定が2施設とも目視で行われていたため、解析担当の方で追試を行い OD 値を測定した。

スクリーニング用2試薬についての使用パネルは以下の通りである。

○PAKPLUS…各100名以上のCaucasian, Hispanic, African American 由来の血小板を均等な割合で混合。

○LAT-Mixed…A ローカス20種類, B ローカス43種類, C ローカス15種類 (A43は含まない)。

この2試薬に関して、IgGクラスClassI抗体陽性の三検体の OD 値を比較した場合、SH1902とSH1904の反応の強弱に違いが見られた。(表4) PAKPLUSはSH1902の方が強く反応しているのに対して、LATではSH1904の方が強く反応しており、FlowPRAと同様の反応を示していた。ちなみに、LAT-Mixedにおいて反応にバラツキが見られるが、それはテラサキトレを使用しているため繊細な操作が必要となり、洗浄等でバックグラウンドが上

昇した為だと考えられる。

試薬間で反応に違いが見られたのは、使用している抗原の種類に依存した結果と考えられる。PAKPLUSでは欧米人由来の抗原が使用されているため、欧米で抗原頻度の低いB54・B59・B67等の抗体検出に期待できないことが予測される。

今回の血清SH1904にはB54・B59・B67に対する抗体が含まれていた。そのため、LAT-Mixedでは強かった反応がPAKPLUSでは弱くなり、相対的にSH1902とSH1904の反応が入れ替わったのではないだろうか。LATとFlowPRAの反応が類似している結果からもこの様なことが予測された。(表5)

表4 ELISA法の蛍光強度

【PAKPLUS】

		N.C	1901	1902	1903	1904	Lot No
19S005	OD値	0.122	0.102	0.583	1.703	0.260	091306-PP
19S028	OD値	0.135	0.163	0.505	1.983	0.332	
19S012	OD値	0.125	0.110	0.266	1.358	0.258	081606-PP

SH1904<SH1902<SH1903

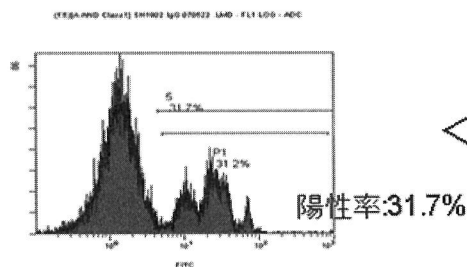
【LAT-Mixed】

	判定	1901	1902	1903	1904
19S017	目視 判定スコア	2	6	8	2
19S018		1	2	8	6
解析担当	OD値	0.016	0.145	0.575	0.320
	判定スコア	1	4	8	6

SH1902<SH1904<SH1903

【参考:FlowPRA】

SH1902



SH1904

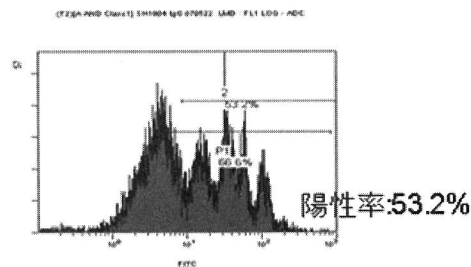


表5 LAT-1HDの判定結果

【LAT-1HD】

	強陽性	陽性
SH1902	B18,B35,B37,B51, B52,B53,B73	
SH1904	B53,B55,B63 <u>B67</u>	B13,B18,B35,B39,B51, <u>B54</u> B56,B58 <u>B59</u> B71, B72,B78

欧米人に低い頻度の抗原・・・B54,B59,B67

第11回 HLA-QC ワークショップレポート (抗体部門) —検査方法別解析 (FlowPRA 法)—

山本賢(国立循環器病センター), 日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会

1. はじめに

今回, FlowPRA Screening 参加施設は 22 施設で, うち FlowPRA Single Antigen は 15 施設であり, Single Antigen の参加施設が昨年と比べ倍近く増加しており, 抗体特異性の必要性が高まっていると思われる。HLA 抗体 QCWS の提出血清 4 種類(1901, 1902, 1903, 1904)について Screening と Single Antigen の解析を行った。

2. FlowPRA Screening における解析(表 1)

1) IgG 抗体 (HLA-classI: 22 施設, HLA-classII: 19 施設)

HLA-classI 抗体: 4 種類の血清について, 抗体有無の一致率は 1901, 1902 がそれぞれ 91%, 96%, 1903, 1904 については結果が一致していた。

HLA-classII 抗体: 1901 で 95% であったが, それ以外について結果は一致していた。

また 1 施設において判定結果は一致していたが, ヒストグラム (HG) の全体が確認できず, 機器設定が正しくできていないと思われる。

2) IgM 抗体 (HLA-classI: 7 施設, HLA-classII: 5 施設)

HLA-classI 抗体: 全血清で結果はすべて一致していた。

HLA-classII 抗体: 1903, 1904 で 80% であったが, 1901, 1902 は一致していた。

3. FlowPRA Single Antigen における解析

HLA-classI IgG 抗体特異性: 1902 の判定結果はほぼ一致していたが, 1903 は A locus, 1904 は B locus で検出された抗体の特異性にばらつきが認められた(図 2, 3)。

4. まとめ

HLA 抗体の有無において, IgG および IgM でそれぞれ 4, 2 施設で判定結果が不一致であった。現状, HLA 抗体の有無について, 全参加施設の結果が全て一致となっていない。この原因として, 毎年指摘されている, ①カットオフの設定, ②測定機器の設定, の 2 点である。いまだに, 各施設においてカットオフおよび機器設定は異なっており, 共通の基準が決まってない。また HLA 抗体特異性についても同様である。このため, 早急に共通の基準(暫定的に)を決めるなどし, 判定基準などの検討を行い, 各施設統一した基準を決定する必要があると思われる。

表 1 HLA 抗体有無の一致率

IgG 抗体

血清	HLA class I	HLA class II
1901	90. 9%(20/22)	94. 7%(18/19)
1902	95. 5%(21/22)	100%(19/19)
1903	100%(22/22)	100%(19/19)
1904	100%(22/22)	100%(19/19)

IgM 抗体

血清	HLA class I	HLA class II
1901	100%(7/7)	100%(5/5)
1902	100%(7/7)	100%(5/5)
1903	100%(7/7)	80. 0%(4/5)
1904	100%(7/7)	80. 0%(4/5)

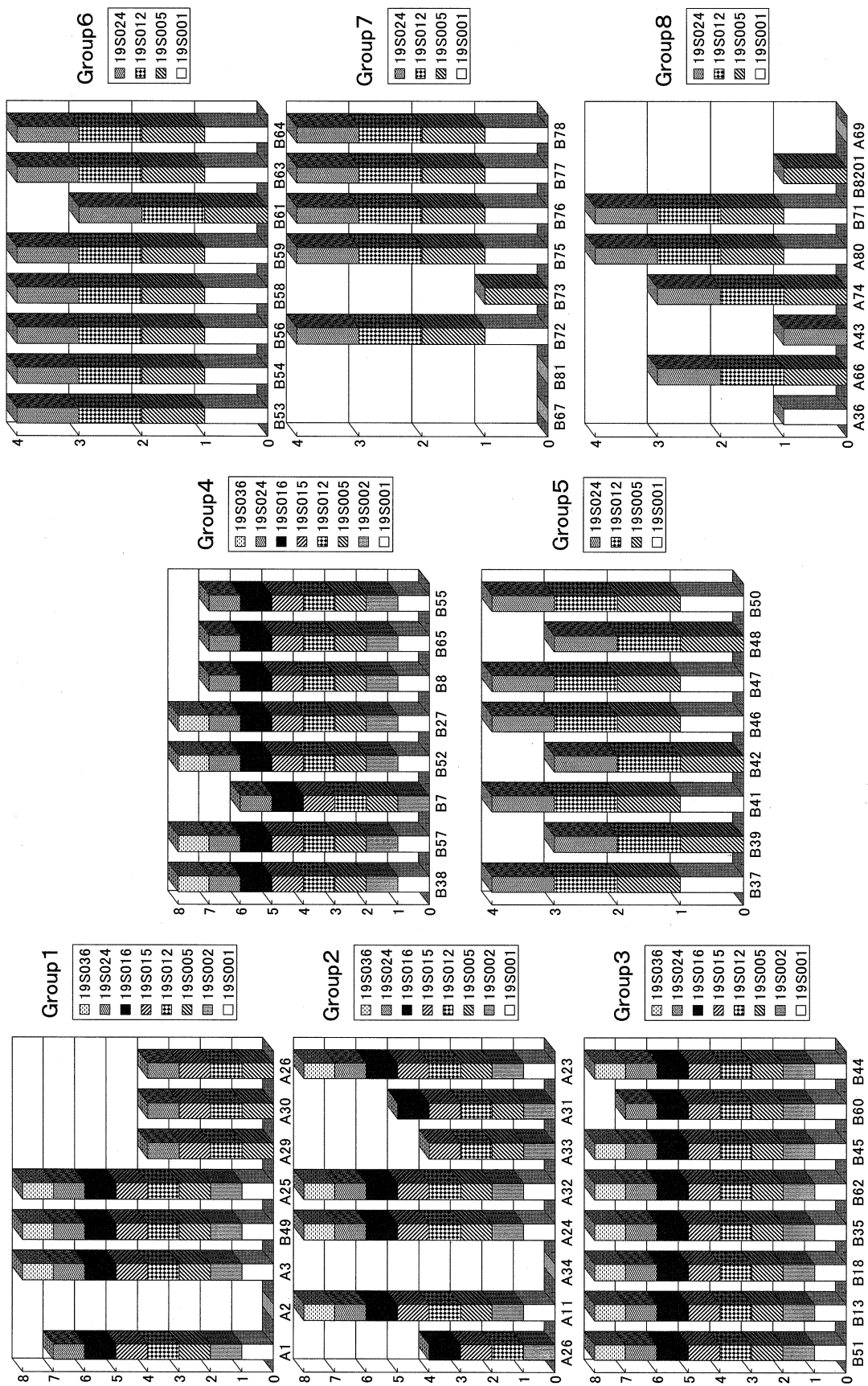


図 1 FlowPRA Single Antigen の抗体特異性 (1903)

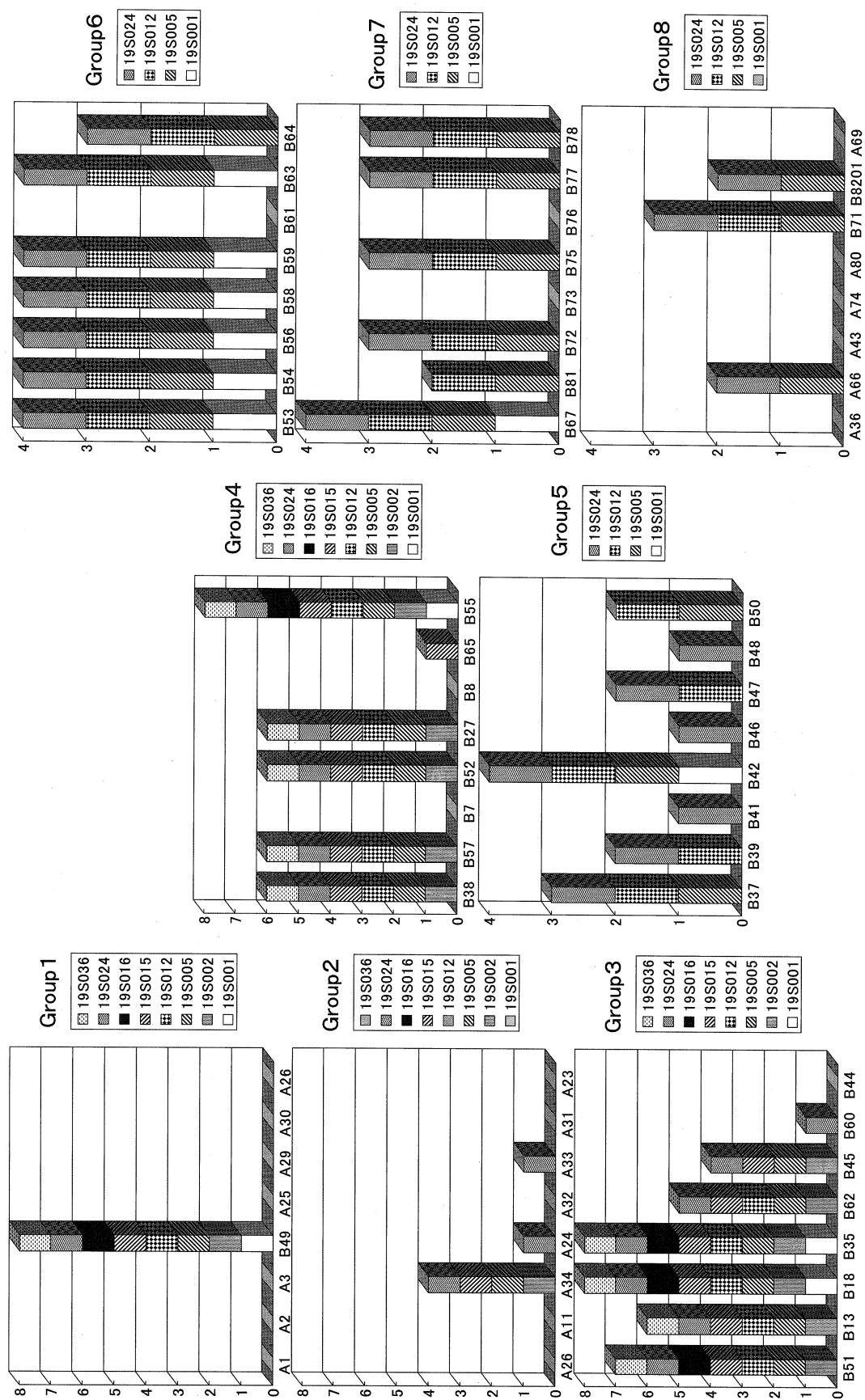


図 2 FlowPRA Single Antigen の抗体特異性 (1904)

第11回 HLA-QC ワークショップレポート (抗体部門) —方法論別検討 (LABScreen 法)—

高陽淑(大阪府赤十字血液センター), 日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会

1. LABScreen による抗体の有無の結果比較 今回 LABScreen 法による検査実施施設は 11 施設

であった。各施設が使用した LABScreen 検査試薬と、各サンプルの検査結果を表 1 (クラス I), 2 (ク

表 1 検査方法と抗体検出の有無(クラス I)

施設 コード	クラス I				検査方法および備考
	1901	1902	1903	1904	
S026	1	8	8	8	P, S (G1&2&3:Lot.6)
S025	1	8	8	8	P, S (G1&2:Lot.6)
S021	1	8	8	8	P
S019	1	8	8	8	S(G1:Lot.7)
S013	1	8	8	8	M, S(G1&2:Lot.6)
S009	4	8	8	8	M
S008	8*	8	8	8	P, S(G4:Lot.1) *A11&25抗原に対して抗体陽性
S007	8*	8	8	8	P, S(G4:Lot.1) *A11&25抗原に対して抗体陽性
S006	1	8	8	8	S (G4:Lot.1)
S005	1	8	8	8	M, P, S (G4:Lot.1)
S004	1	8	8	8	M, P, S(G1&2&3:Lot.7)

1:抗体なし 4:保留 8:抗体有り M:Mixed, P:PRA, S:Single antigen(ロットNo.)

表 2 検査方法と抗体検出の有無(クラス II)

施設 コード	クラス II				検査方法および備考
	1901	1902	1903	1904	
S026	8	1	1	8	P, S (Lot.3 * 1901,1904のみ実施)
S025	1	1	1	1	P
S021	8	1	1	4	P
S013	8	1	1	1	M, S (Lot.3 * 1901のみ実施)
S009	8	1	1	1	M
S008	8	1	1	8	P, S (Lot.4)
S007	8	1	1	8	P, S (Lot.4)
S006	1*	1*	1*	1*	P, S (Lot.2) *singleのRatioが低い
S005	8	1	8*	8	P, S (Lot.4) *DR1&4抗原に対して抗体陽性と判定
S004	8	1	1	8	P, S (Lot.4)

1:抗体なし 4:保留 8:抗体有り M:Mixed, P:PRA, S:Single antigen(ロットNo.)

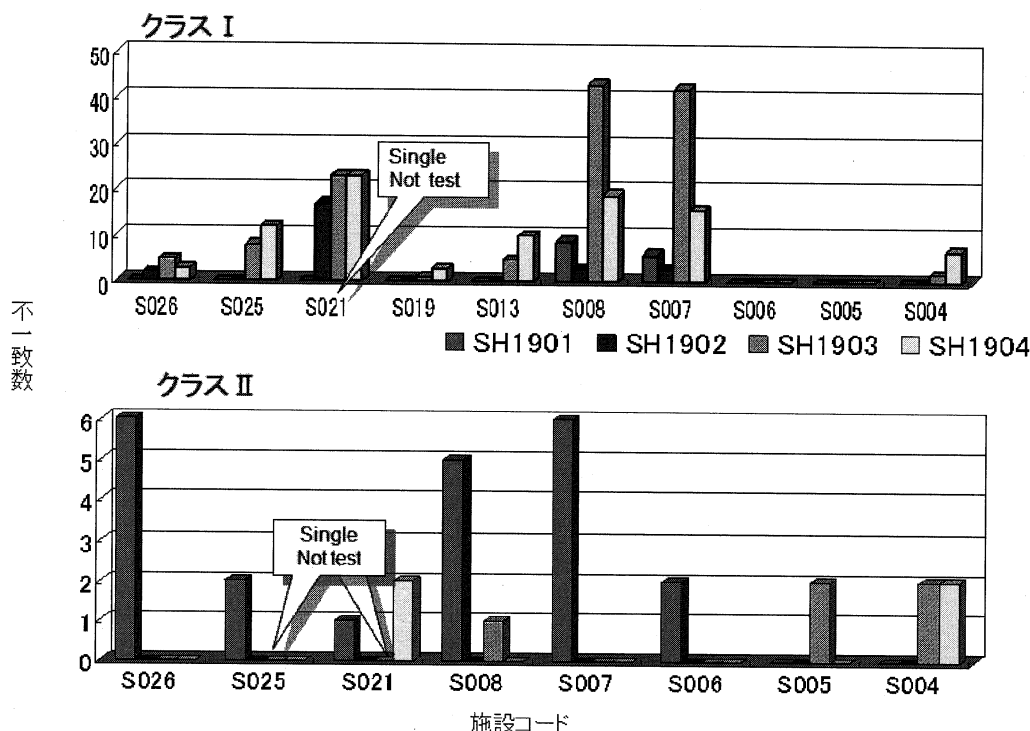


図1 施設別判定スコア不一致数

ラス II) に示す。クラス I での一致率は SH1901 が 72.7% であったが、それ以外は 100% であった。また、クラス II に関しては SH1902 以外の検体では 100% の一致率を得られなかった。そこで今回は LABScreen を実施した施設間の比較・解析を行い、最終判定に不一致が生じる原因の究明を試みた。

2. 判定結果の比較

判定スコアが未記入であった 1 施設を除外し、10 施設の各サンプルの HLA 抗原別判定スコアを比較した。自施設のスコアが他の 8~9 施設と違う場合を不一致と定義してその数を検体ごとに棒グラフで示した。その結果、クラス I の判定スコアに他施設との食い違いが多いのは偏った施設であったが、クラス II での判定スコアは全体的にばらついていた(図 1)。Single antigen が未実施である施設は判定スコアに他施設との食い違いが多く、個々の抗原に対する判定を PRA のみで行うことは困難であると思われる。また single antigen を実施しても判定基準の違いや試薬のロット間差が判定結果に反映している事が示唆された (4. single antigen による解析の項

参照)。

3. 同一 Lot での PRA 反応性の比較

PRA を実施した 7 施設の使用ロットが同一ロット (Lot. 10) であったので反応性の施設間差について解析した。但し、陰性血清のデータが無い 1 施設はこの解析からは除外している。検体別に施設間での一致率を全ビーズの測定値について折れ線グラフで表した(図 2)。クラス I では SH1904 が、クラス II では SH1901 のばらつきが大きいようであった。SH1904 の例を図 3 に示す。これは PRAI の 55 種類のビーズのうち測定値の一致率が低かった 22 種類のビーズについて陰性血清および SH1904 での Median 値の比較を行ったものである。陰性血清に比較して SH1904 で Median 値のばらつきは大きく、全体に値が高め、あるいは低めと施設によって Median 値に傾向があることも判明した。またこの傾向は SH1904 以外の検体においても同様であった。原因としては測定に用いる二次抗体を含めた試薬の保存状態や Luminex 機器の特性等が関係しているのではないかと推測する。

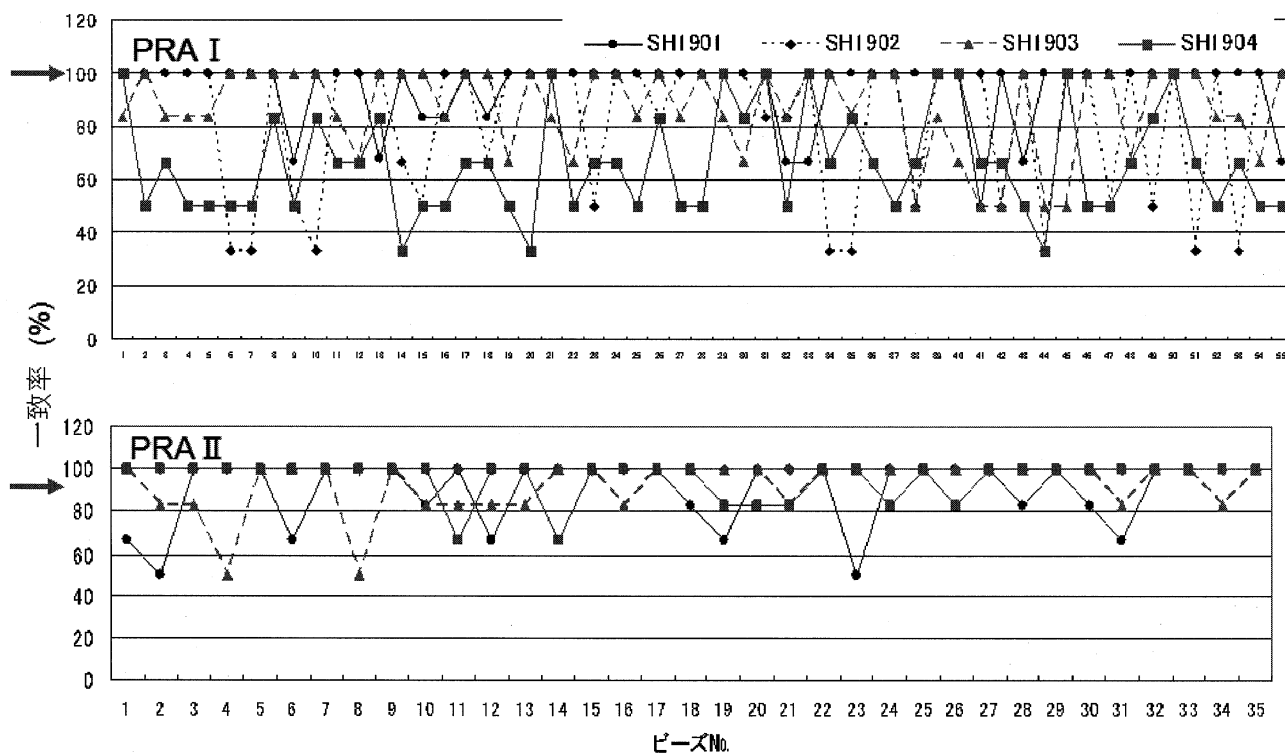


図2 PRA 各ビーズ測定値の一致数

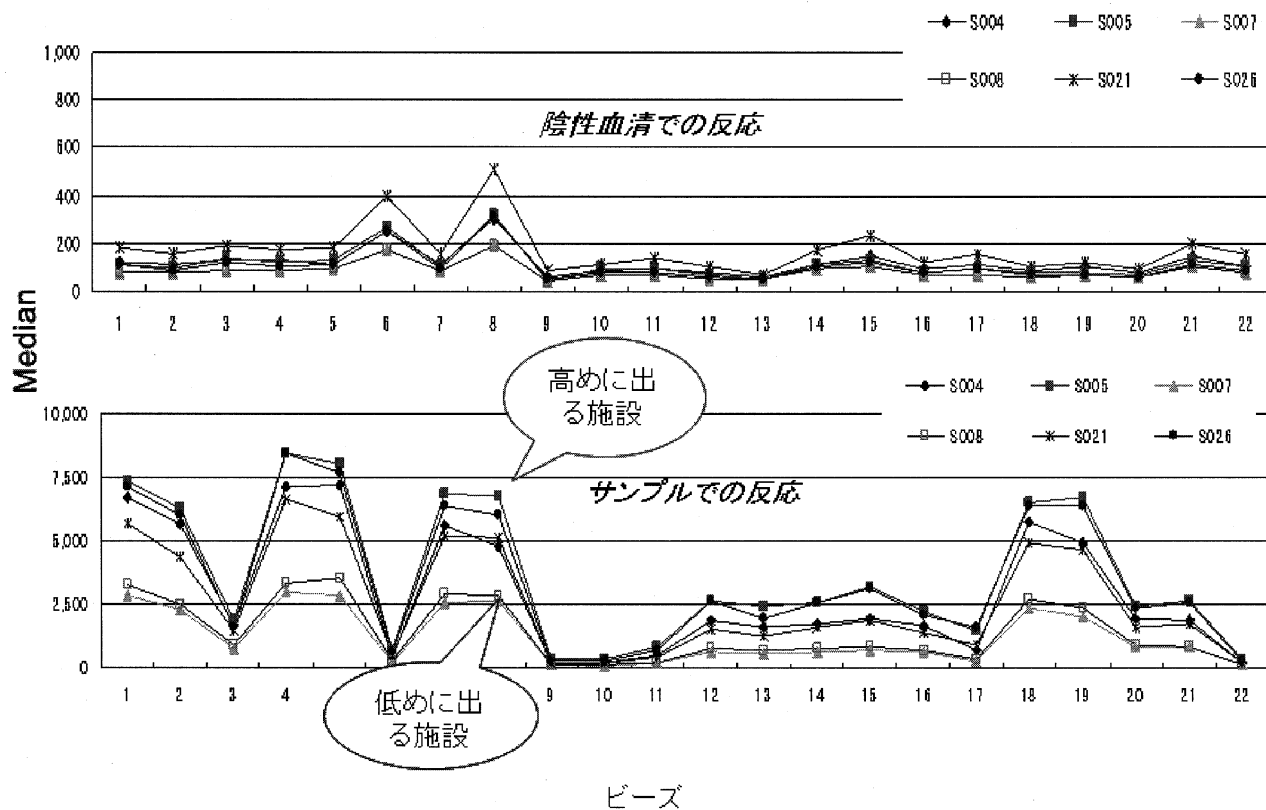


図3 一致率が低いビーズでの反応性の比較(SH1904)

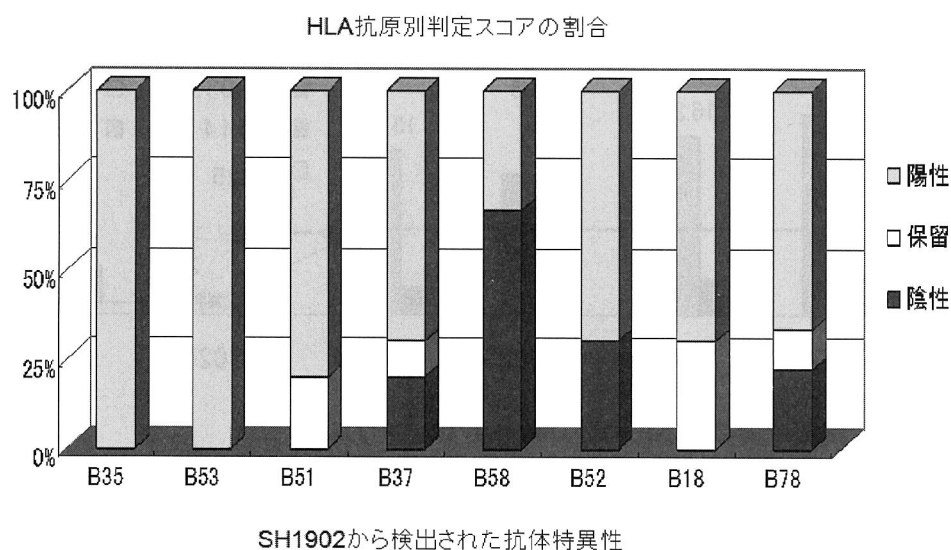


図4 判定結果不一致原因の検証(SH1902: クラス I)

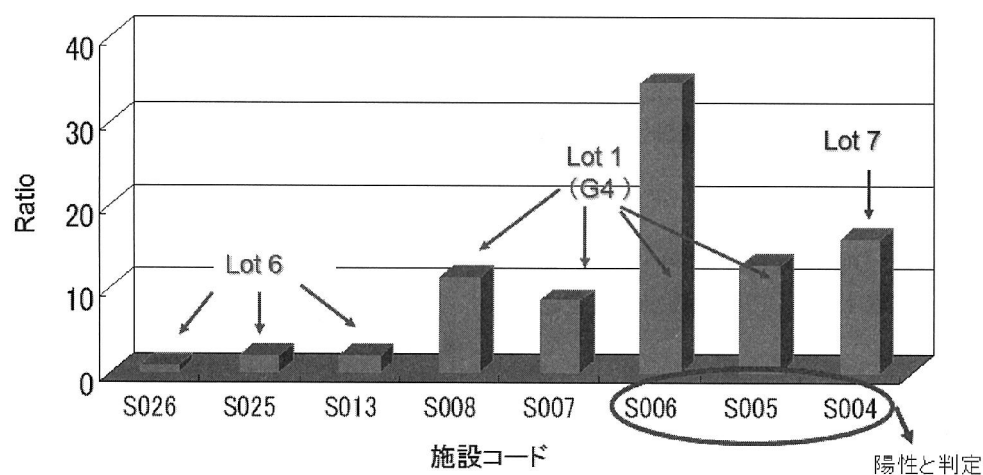
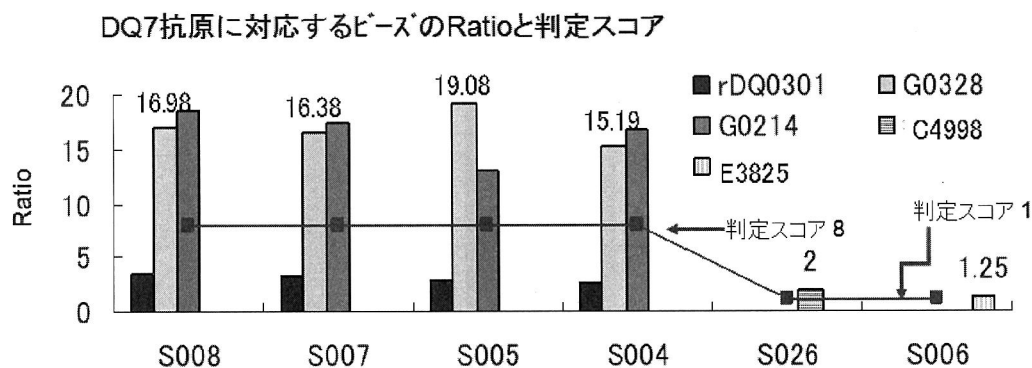


図5 B*5801 ビーズにおける Ratio 比較(施設別)

4. Single antigen による解析

判定スコアの決定にあたってその根拠となるデータは Single antigen での検査結果であろう。そこで最終判定に不一致が生じる原因を調査する為に、各検体において不一致率の高い抗原の Single antigen での反応性を比較した。その一例として SH1902 の場合を示す(図4)。図の X 軸は SH1902 から LABScreen によって検出されたクラス I の抗体特異性で、棒グラフは実施した 10 施設の各抗原に対する判定スコアの偏りを表している。B58 以外は 75% 以上の施設がこれらの特異性を検出できた。またこれらの特異性が導き出せなかったのは一部の施設に偏っており、その原因は single antigen が未実施で

あるか、あるいは判定基準の差異によるものと推測された。次に、陰性と判定した施設が 50% 以上あった B58 抗原に対する反応性を比較した(図5)。図は提出された CSV ファイルから HLA Visual を用いて得た Ratio の比較であるが、ロットによる反応性の差異が結果判定に食い違いを起こした要因であろうと考える。この傾向はその他の検体においても同様であった。またクラス II においても同様の事例を一例示す(図6)。これは DQ7 抗原に対応するビーズのロット毎の antigen ID とそのアリルをまとめたものであるが、ロットによって含まれるビーズの種類と反応性に差異があり、それが判定スコアの食い違いに反映していると考えられた。この図に示したの



DQ7抗原に対応するビーズのAntigen IDとアレルタイプ

Lot	Antigen ID	DQB1	DQA1	使用施設
4	rDQ0301	*0301	*0301	S008,S007, S005,S004
	G0328DQ0301	*0301	*0303/0505	
	G0214DQ0301	*0301	*0601	
3	C4998DQ7	*0301	*05	S026
2	E3825DQ7	*0301	*0401/0505	S006

図6 判定結果不一致原因の検証(SH1904: クラス II)

はDQ7の例であるが、DQ8、DQ9、についても、またSH1901の例ではDRについても同様の現象を認めた。

5. IgM 性抗体の検出

IgM 性抗体の検出に関しては実施施設が2施設であったが、両者のデータ比較を行った。抗体の有無ではSH1904のクラス II 以外は全て一致していたが、個々の抗原に対する判定スコアには大きな差異を認めた。この原因としては各抗原に対するビーズの反応性の差が判定スコアに反映したものと考えられる。但し参加施設が少なく、今後はプロトコール等を見直した上で3施設以上のデータで検討する必

要があると考ええる。

6. まとめ

PRAについては、同一ロットであっても反応性に施設間差がみられたことから、自施設のプロトコール、Luminexのメンテナンスや試薬の管理方法等の見直しが必要と考える。

Single antigenについては、ロットによる反応性の差異を認めたことからその切換え時にはロット間でのデータ検定を行う等の管理も必要であろう。その上で、標準化に向けて今後は判定基準の統一を図っていく事が重要課題であると考ええる。

第11回 HLA-QC ワークショップレポート (抗体部門) —HLA 抗体検出試薬 (WAK Flow HLA クラス I 抗体 MR)—

田中秀則(東京都赤十字血液センター検査), 日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会

1. はじめに

蛍光ビーズ (Luminex システム) を用いた HLA 抗体検査試薬は, 高感度に HLA 抗体を検出する試薬とし市販されており, 使用している精製 HLA 抗原(パネル細胞由来)は, WHO 公認抗原を網羅し抗体同定用として主に用いられている。

血液センターでは, HLA 抗体が原因となる血小板輸血不応 (PTR) 症例に対して HLA 適合血小板製剤を供給しており, 事前に HLA 抗体スクリーニングおよび HLA 抗体陽性症例の許容抗原 (HLA 抗体陰性抗原) 確認検査を行う必要がある。日赤では, これらの HLA 適合血小板製剤の供給に伴う検査を効率良く行うために, 日本人に多く見られる HLA 抗原および HLA ハプロタイプを有するパネル細胞 (EBV トンラフォーム細胞) から抽出した精製 HLA 抗原を用い, 蛍光ビーズによる HLA 抗体検出試薬 (注)を開発した。

開発した試薬に用いたパネル細胞(精製 HLA 抗原)は, 許容抗原確認を容易にすることおよび抗体検出感度を高めることを目的として ① HLA-B 抗原型の組み合わせが同じ交差反応抗原群(例: B54 と B55, B60 と B61 等)であること ② HLA ハプロタイプがホモ接合であること(例: A24-B52-Cw12, A33-B44-Cw14 のホモ接合等)とし, 日本人における遺伝子頻度が 1% 以上の HLA 抗原を網羅するように選択した(表 1 参照)。

今回の HLA-QC ワークショップでは, IgG 抗体について 7 施設からデータが提出され, 全施設で添付品の二次抗体 (抗 heavy chain & light chain) を使用しており, 1 施設で他社 (Jackson) の二次抗体 (抗ヒト IgG 抗体) を使用したデータが提出された。IgM 抗体については, 2 施設からデータが提出され, 19S005 では 3 種類の二次抗体 (抗ヒト IgM 抗体) を用いたデータが提出された(表 2)。提出されたデー

表 1 WAKFlow HLA 抗体クラス I (MR) 使用パネルセル

No.	B.No.	A-1	A-2	B-1	B-2	Cw-1	Cw-2	CREG
1	Pc01	A2	A11.2	B54	B55	Cw1	-	B22 & B7
2	Pc08	A11.1	A24	B54	B59	Cw1	-	
3	Pc13	A24	-	B54	-	Cw1	-	
4	Pc18	A24	A31	B7	B56	Cw4	Cw7	
5	Pc12	A24	-	B7	-	Cw7	-	
6	Pc25	A11.1	-	B54	B67	Cw1	Cw7	
7	Pc09	A2	A31	B7	B13	Cw10	Cw7	
8	Pc19	A24	-	B60	B61	Cw8	Cw10	B40
9	Pc15	A26	-	B61	-	Cw10	Cw8	
10	Pc02	A2	A31	B48	B61	Cw10	Cw8	
11	Pc06	A26	A26	B51	B52	Cw10	Cw12	B5
12	Pc10	A24	-	B52	-	Cw12	-	
13	Pc21	A31	-	B51	-	Cw14	-	
14	Pc17	A24	A26	B35	B46	Cw9	Cw10	B15 & B35
15	Pc04	A24	-	B62	B71	Cw7	Cw9	
16	Pc14	A11.1	-	B62	-	Cw4	-	
17	Pc05	A24	-	B62	B75	Cw9	-	
18	Pc22	A2	A33	B46	B58	Cw1	Cw10	B16
19	Pc24	A24	A31	B39	B67	Cw7	-	
20	Pc20	A2	-	B39	-	Cw7	-	
21	Pc07	A1	A33	B37	B44	Cw6	Cw14	B44 & B37
22	Pc11	A33	-	B44	-	Cw14	-	
23	Pc16	A3	A33	B44	B44	Cw5	Cw14	
24	Pc23	A3	-	B44	-	Cw5	-	
25	Pc26	A26	-	B61	B44	Cw10	Cw14	

■: はホモ接合パネル細胞

B.No.: ビーズ番号

表2 参加施設および使用二次抗体

—WAKFlow HLA クラス I 抗体 (MR)—

参加施設数: 7 施設

Lab No.	IgG	二次抗体*		IgM	二次抗体*	備 考
		添付品	その他			
19S003	○	○	—	—		
19S005	○	○	JA	○	SE, BI, CE	
19S006	○	○	—	○	JA	
19S021	○	○	—	—		
19S026	○	○	—	—		
19S027	○	○	—	—		吸収操作有
19S032	○	○	—	—		

○: データ提出有り、—: データ提出無し

* 二次抗体: メーカー名 JA(Jackson)、SE(Serotec)、BI(Biosource)、CE(CellLab)

表3 WAKFlow HLA 抗体クラス I (MR) 測定データの解析

・Index値(NBG Ratio)での判定

陰性血清との反応データに基づき、検体の測定データを指数化(Negative Background Ratio)し、各ビーズでの反応性を判定する。

・Index値の計算方法(蛍光強度: Meidenを使用)

$$\text{Index値} = \frac{\text{検体と\#ビーズとのシグナル} \div \text{検体とBlankビーズとのシグナル}}{\text{NS*と\#ビーズとのシグナル} \div \text{NS*とBlankビーズとのシグナル}}$$

NS: negative serum

・Cutoff 値: 検体毎に交差反応性等を考慮し決定する必要がある。

(弱陽性の例では、indexが2以上で陽性と判定可能であった)

タ(蛍光値: Luminex の測定データである median) および蛍光値から算出される Index 値 (Negative Background Ratio, 表3 参照) から、各ビーズとの反応性を比較することにより、HLA 抗体の有無および HLA 抗体の特異性を各検体について考察した。

2. 結果および考察

2.1. IgG 抗体

二次抗体が添付品または抗ヒト IgG 抗体の蛍光値を図1に示す。試薬の添付品である二次抗体を用いた場合の蛍光値では、施設間での大きな違いは見られず、安定した結果が得られた。S05-2 は、添付品以外の抗ヒト IgG 抗体を二次抗体として用いた結果であり、添付品での二次抗体の蛍光値と比べ高い値

を示した。蛍光値から算出された Index 値を、図2にグラフで示した。添付品以外の抗ヒト IgG 抗体では高い蛍光値を示したが、Index 値では添付品での Index 値と大きな違いは見られなかった。

SH1901 は、各ビーズおよびバックグラウンドビーズ共に高い蛍光値(約 4,300–6,400)を示し、全ビーズで Index 値も2以下となり、非特異的な反応が否定出来ない検体であった。他の3検体の Index 値は高い値を示し、クラス I 抗体陽性と判定された。SH1902 は、カットオフ値を2前後で設定することにより Pc17, Pc21, Pc07, Pc10 のビーズに対して陽性と判定され、B5+B35 の特異性が推察された(各ビーズの HLA タイプは、表1 参照)。SH1903 は全てのビーズに反応を示し、許容抗原も見出せなかつ

図1 HLA-QCWS 各検体での蛍光値 (IgG 抗体)

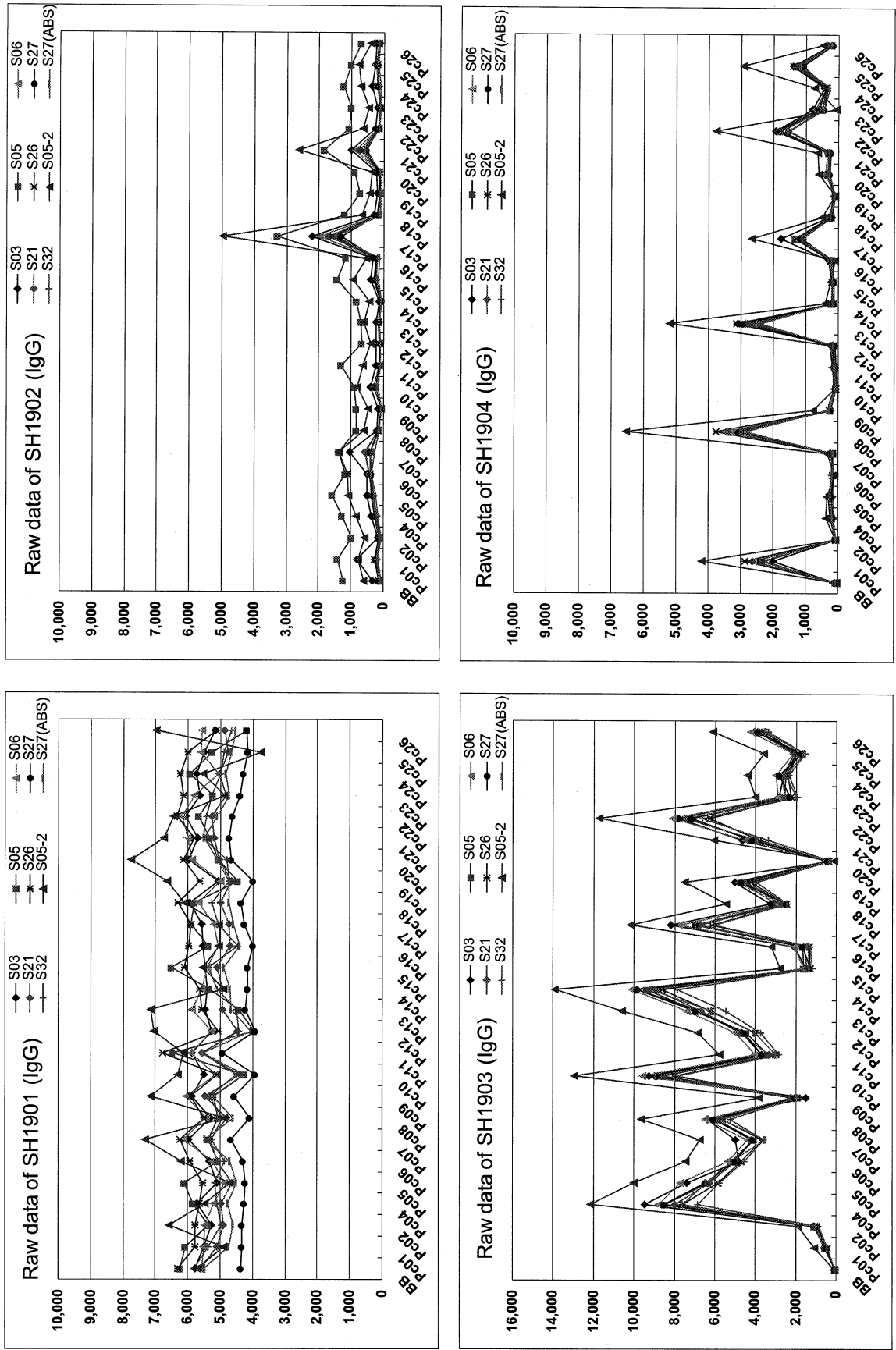


図2 HLA-QCWS 各検体での Index 値 (IgG 抗体)

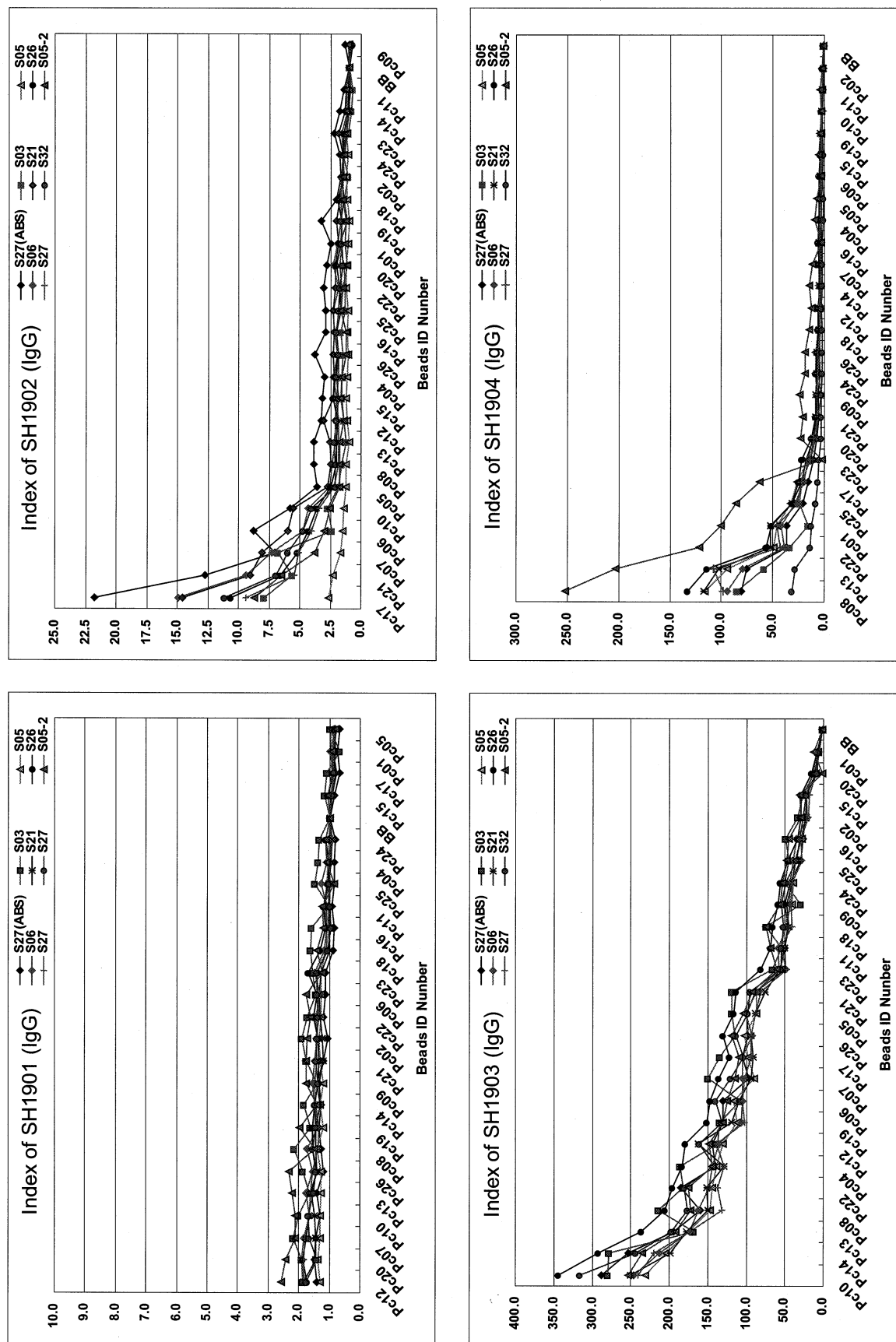


図 3 HLA-QCWS 各検体での蛍光値 (IgM 抗体)

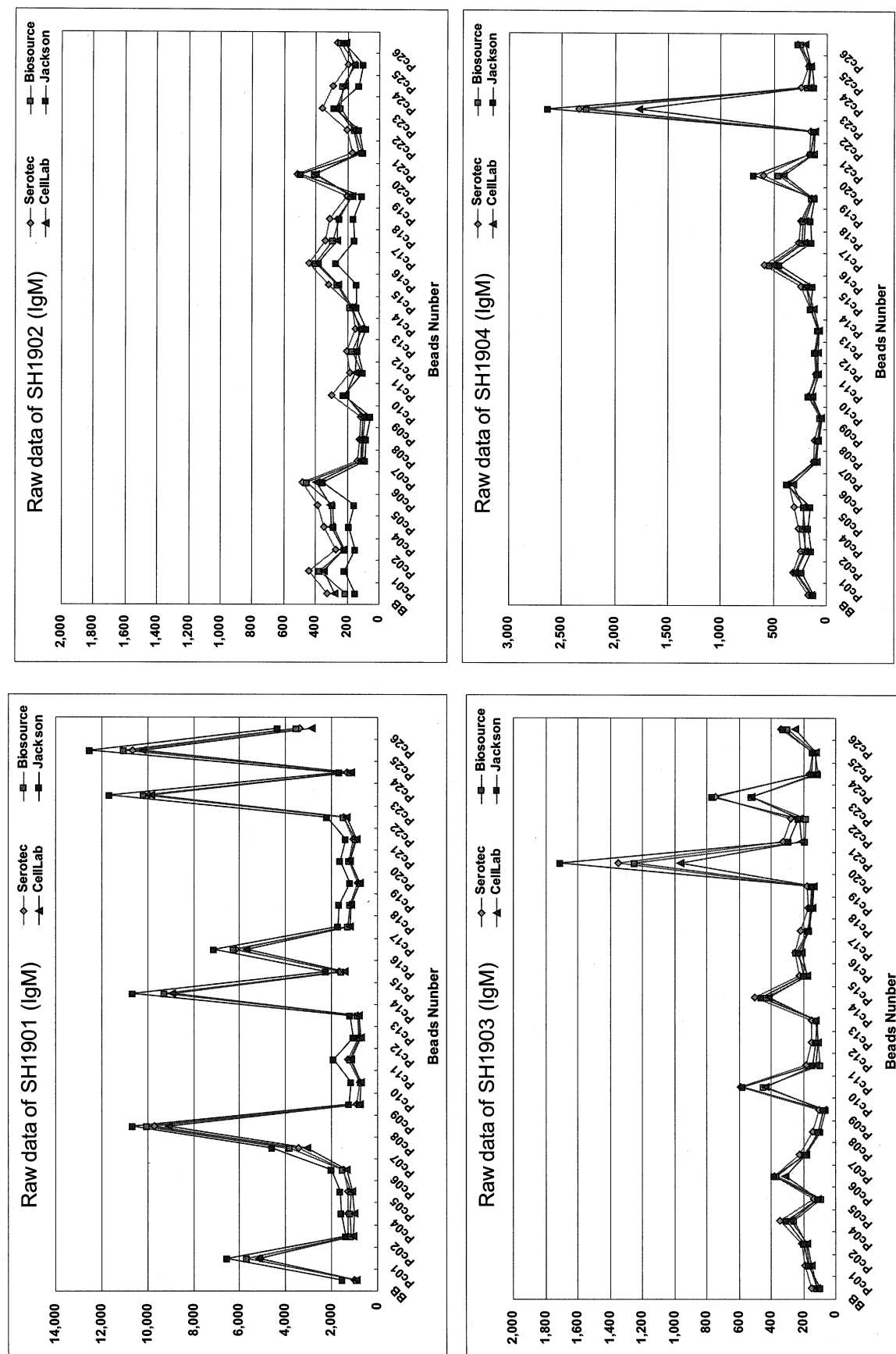
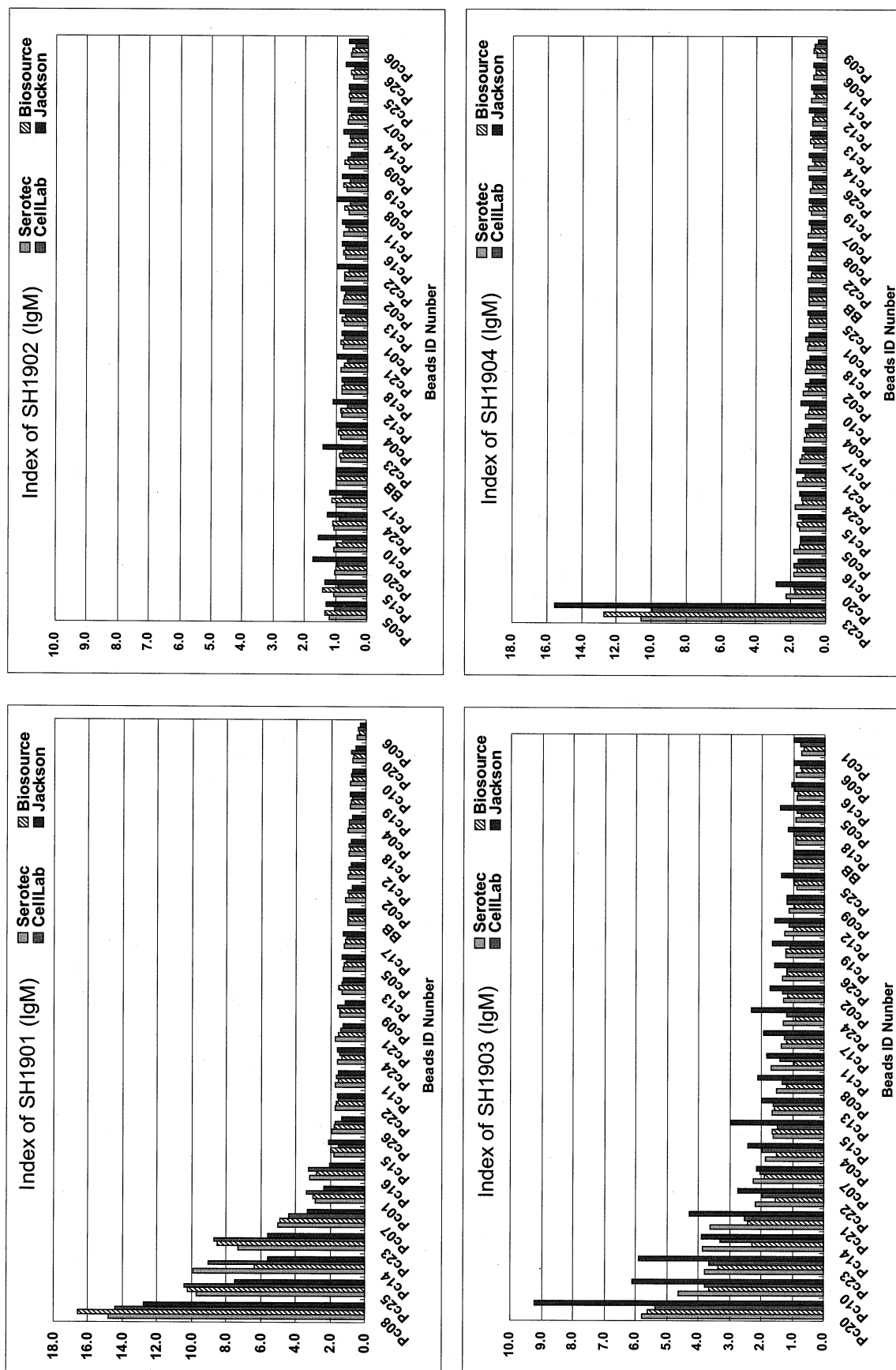


図4 HLA-QCWS 各検体での Index 値 (IgM 抗体)



た。SH1904 は、ビーズ番号 Pc08, Pc13, Pc22, Pc01, Pc25 に対して強い反応を示し、Cw1 の特異性が推察されたが、他のビーズにも反応が認められたことから、Cw1 以外の特異性もあると思われる。Pc10, Pc19, Pc15, Pc11, Pc02 に反応は認められないことから、HLA-A24, A26, A2, A31, A33, B44, B48, B60, B61, B52 抗原に対する抗体は認められず、このことは LABScreen Single Antigen でも同様であった。

施設 No. S27 では、バックグラウンドを抑えるための吸収操作を各検体について行っているが、何れの検体において吸収操作による蛍光値および Index 値に大きな変化は認められなかった(図 1 および 2 の S27 (ABS) を参照)。

2.2. IgM 抗体

IgM 抗体の検出では、使用された二次抗体による蛍光値の大きな違いは見られなかったが、Cell Lab で低値を、Jackson で高値を示す傾向にあった(図 3 参照)。Index 値でも大きな違いは見られず、二次抗体が Jackson の場合 SH1901 では低く、他の 2 検体 (SH1903 および SH1904) では高くなっていた。

SH1901 では、ビーズ番号が Pc08, Pc25, Pc23, Pc14, Pc07, Pc01, Pc15, Pc16 に反応が見られ、

HLA-A1, A3, A11, A26 抗原に対する抗体特異性が推察された。SH1902 は Index 値も 2 以下であり陰性と判定された。SH1903 は、陰性と判定は出来ないが、特異性は明確ではなく、LABScreen Single Antigen でも HLA-B15, B35, B5 関連抗原に対する反応は見られたが、強い反応ではなかった。SH1904 はビーズ番号 Pc23, Pc20, Pc16 に反応を示し、HLA-A3 抗原に対する抗体特異性が確認された。

3. まとめ

施設間の差が認められず良好な結果が得られた。広範囲の特異性を有する検体では、明確な特異性の確認は出来なかったが、許容抗原 (HLA 抗体陰性抗原) の確認は可能であった。また、IgM 抗体も二次抗体に抗ヒト IgM 抗体を使用することにより、検出が可能であることが確認された。

注：開発した HLA 抗体検出試薬は、日本赤十字社血液事業研究課題「蛍光ビーズ (Luminex) を用いた、白血球 (HLA・顆粒球) および血小板抗原に対する抗体検査法の開発」において、湧永製薬との共同研究において開発された試薬である。