

第 12 回 HLA-QC ワークショップ DNA 部門 データ解析 (6) WGA 法

分担者： 安波道郎 (長崎大学・熱帯医学研究所)

1. はじめに

全ゲノム増幅法 (Whole genome amplification, 以下 WGA 法) は、限られた量の検体から多項目のゲノム多型の検索を施行するという要請に応じて開発された方法である。したがって、その実用性は、いかに少量の試料から十分量の産物を、いかに正確 (即ち元の試料の検査結果を忠実に再現できるか) によって評価される。当初はランダムな配列に対応したオリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR 法に基づくものが開発されたが、忠実性に保証がなく、現時点ではそれにとって代わり ϕ 29 フェージ由来 DNA ポリメラーゼを使用した multiple strand displacement 法に基づくものが広く使用されている。(第 10 回 HLA-QC ワークショップ研究集会にて解説した。) 本法は、すでに過去数年にわたって HLA-QC ワークショップ DNA 部門の配布試料の一部に適用されており少なくとも総合判定で誤った結果が導かれることはないようであるが、個々の生データでは増幅前の試料とは異なる反応性を示すこともある。今回、WGA 法に伴う問題点について考察したい。

2. WGA 法の実施状況

前述のように、WGA 法が要請される状況は輸血・移植検査の現場ではほとんど生じることはないと思われる。第 12 回 HLA-QC ワークショップ DNA 部門に参加した 57 施設あてに電子メールで聞き取り調査したところ、回答 33 施設中 25 施設(76%)は WGA 法の経験なく、7 施設は経験あるが日常的には施行していない、1 施設が日常的に施行しているという内訳だった。今回のワークショップで実施した施設は 1 施設のみだった。施設間での WGA 法技術の評価するには、本法の実施がまだ十分に浸透していないと考え今回は行なわなかった。

3. WGA 法が HLA タイピング結果に影響するか?

配布試料 H2004 は、今回初めて採用した「FTA Elute」H2002 の細胞を付着させた H2006 から Qiagen 社の REPLI-G キットを使用して調製したものである。WGA 法の HLA タイピングに及ぼす影響を評価するには、H2002 と H2004 の結果の一致度を見ればよい。今回の「方法論別解析」「総合判定」の諸項を見ればわかるように、最終的なタイピングのアサインにおいて WGA 法を適用した H2004 の方が劣るということは全くない。問題点としては、結果を報告している施設数が A、B、C、DRB1 座位のいずれでも 2-5 施設少ないことで、これが、配布 DNA 量が不十分であったためなのか、タイピング結果が報告に値しなかったのかわからないことである。配布 DNA 量についてはワークショップ運営費の問題なので以後改善可能である。

個々の反応性については、SSP 法 SSO 法ともに H2002 と H2004 間での不一致がわずかながら散見され、それによる方法論毎のアサインメントに不一致（不正解）を生じているようである。しかし、この不一致は必ずしも WGA 法を適用した H2004 の方が高頻度ということではなかった。むしろ重複検体(duplicate samples)間での再現性の問題と思われた。

4. WGA 法はどのようにとらえられているか？

前述の聞き取り調査で、実施状況にあわせて、WGA 法に問題があるかを問い合わせたところ、経験施設のほとんどが、概ね問題はないが若干の問題はあると回答した。内容としては、アリル間で同等に増幅されず偏ってしまう、元試料の質（および量）によっては信頼性が落ちる、SSP でエクストラな反応が出るなどであった。

一般に、元試料の質に配慮すること、複数の方法で確認することの 2 点でほとんど問題は解決できるととらえられているようであった。

5. おわりに

筆者は、試料保存の施設の整備が極悪の状況下で最低の侵襲度でゲノム研究試料を多数収集するために毛細管血数滴をフィルターに採取して、日常的に WGA 法を適用して材料としている。FTA カードから直接 PCR 法で特定のゲノム領域を増幅する方法と、FTA カードから WGA 法で一旦全領域について増幅した後に特定のゲノム領域を PCR に供する方法を併用して、WGA 法にもとづくエラーを回避している。内部的にはクォリティーコントロールとして、比較的長い領域の PCR を施行して、個々の検体を評価している。

第 12 回配布試料 H2004 の調製も筆者の研究室で行なった。H2004 の質に問題があるならば、WGA 法自体の問題よりも筆者の研究室のクォリティーを問われることになるが、今のところ明らかな不都合はなさそうである。