

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過およびサンプルの総合結果—

田中秀則¹⁾・中島文明¹⁾

日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会QCWS 部会[#]

¹⁾ 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

1. ワークショップの経過

平成 24 年 1 月から QCWS 開催および参加申込みについて、学会誌および学会ホームページ（以下、学会 HP）に掲載することで案内した。前回から QCWS への参加主体を、会員個人から施設に変更し、平成 24 年 2 月までに 57 施設（DNA-QC：53 施設、抗体 QC：38 施設）の参加申し込みがあった（表 1）。

当学会の第 20 回大会期間中に開催した QCWS 部会で検討した方針に従い、DNA-QC および抗体 QC に用いる試料の選択を行った。また、臨床部門別での解析については、今年度も実施することとし、参加申込の際に①輸血、②臓器移植、③造血幹細胞移植、④その他（研究等）の 4 部門における QCWS の結果解析を行った。また、参加施設への連絡およびデータ収集は、電子メールで行った。

4 月 4 日に試料を発送し、4 月 16 日に QCWS 結果入力用のシートファイルをメールの添付ファイルとして参加施設に配布し、結果提出の締切りを 5 月 21 日とした。最終的には 57 施設（DNA-QC：53 施設、抗体 QC：37 施設）から結果が提出された。5 月中に生データの取りまとめ、6 月中に各解析担当者による解析が行われ、7 月中旬に各検査法別結果を学会 HP に順次掲載し、各検査法での解析結果に基づき、部門別解析を行い、その結

果を 8 月 25 日に学会 HP に掲載することで、参加者が必要に応じてダウンロード出来るようにした。

2. QCWS のテーマおよび試料選択について

DNA-QC のテーマは、①正確な DNA タイピングが出来ることおよび第 2 区域まで判定されること、② DNA タイピング結果の表記を正しく記述できること、③学会の表記法に従い正確に表記すること、④ DNA タイピング結果に対応した HLA 抗原型を正確に読替えること、⑤ Ambiguity となるアリの日本人集団でのアリについて解説の 5 点とした。

また、試料については、前年度の QCWS 部会で協議した「日本人由来の細胞で高頻度に検出される HLA 型であること」、「日本人由来で稀な HLA アリルであること」の要件に合う細胞を 4 種類購入し、抽出した DNA の配布を行った。

抗体 QC のテーマは、①抗体検出が正確に行えること、②エピトープと許容抗原により正確な抗体特異性解析が行えること、③検査結果から導かれる総合判定結果を正しく報告できることの 3 点とし、テーマに沿った 4 検体を選択し、配布することとした。また、配布する検体は、「日本人に通常検出される HLA 抗体」を保有する検体で、一部の試料では、HLA-C 座抗原に対する抗体、IgM 性抗体、HLA 以外の分子に対して非特異的な反応を示す

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 部会員

田中秀則¹⁾、石塚 敏²⁾、太田正穂³⁾、吉川枝里⁴⁾、木村彰方⁵⁾、高 陽淑⁶⁾、小林孝彰⁷⁾、佐田正晴⁸⁾、中島文明¹⁾、成瀬妙子⁹⁾、橋口裕樹⁹⁾、宮崎 孔¹⁰⁾、森島泰雄¹¹⁾、安波道郎¹²⁾、山本 賢¹³⁾

¹⁾ 日本赤十字社中央血液研究所、²⁾ 東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室、³⁾ 信州大学医学部法医学教室、⁴⁾ 東海大学医学部生命科学、⁵⁾ 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野、⁶⁾ 日本赤十字社近畿ブロック血液センター、⁷⁾ 名古屋大学移植免疫学寄附講座、⁸⁾ 国立循環器病センター再生医療部、⁹⁾ 福岡赤十字病院、¹⁰⁾ 日本赤十字社北海道ブロック血液センター、¹¹⁾ 愛知県がんセンター研究所疫学・予防部、¹²⁾ 長崎大学熱帯医学研究所、¹³⁾ 国立循環器病センター臨床検査部

場合もある。

また、交差適合試験については、クロスマッチ試験の現状把握のため、以下の 2 通りで試行することとし、参加申込みの受付を行った。

①配布した抗体 QC の検体と各施設で準備した細胞でのダイレクトクロスマッチ

②抗体 QC 試料と DNA-QC 試料の測定結果による仮想クロスマッチ

3. QCWS 集会参加および参加証明書発行

昨年度から、学会大会参加者は QCWS 集会に参加可能となったため、QCWS 集会への参加者数は把握出来ていないが、QCWS 参加証明書の発行依頼は、77 名からあった。

4. 解析方法

検査法別解析は、DNA-QC では① Luminex (SSO 法)、② イノリパ (SSO 法)、③ SSP 法、④ SBT 法および⑤結果の表記法について、抗体 QC では、① FlowPRA 法、

② Lab Screen、③ WAK Flow および ICFA 法、④その他検査法およびクロスマッチの 4 法について解析を行った。

部門別解析は、各検査法別の解析結果から、各参加部門（輸血・臓器移植・造血幹細胞移植）での検査実施状況の解析および「HLA-QC ワークショップ結果評価の基準」に従った提出結果の評価を行い、その状況について解析した。各解析分担項目と解析担当者（所属）は、以下のとおりである。

1, タイピング結果解析

Luminex (SSO 法) について

近畿ブロック血液センター 石井 博之

イノリパ (SSO 法) について

東京女子医大 安尾美年子

SSP 法について

県立広島病院 藤井 明美

SBT 法について

東海大学 医学部 重成 敦子

HLA タイピング結果の表記について

福岡赤十字病院 橋口 裕樹

表 1 第 16 回 QCWS 参加施設

(受付日付順)

1	北里大学病院	臨床検査部 DNA検査室	30	京都大学	iPS細胞研究所・規制科学部門
2	仙台社会保険病院	検査部	31	東海大学	医学部基礎医学系分子生命科学
3	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	32	東北ブロック血液センター	品質部 検査一課
4	名古屋第二赤十字病院	組織適合検査室	33	静岡県立総合病院	輸血・細胞治療科
5	株式会社 医学生物学研究所	品質管理部	34	株式会社ビー・エム・エル	特殊分析部 ゲノム検査 1 課
6	日本赤十字社 中央血液研究所	研究開発部	35	一般財団法人 HLA 研究所	
7	NPO法人腎泌尿器疾患研究所		36	札幌北楡病院	臨床検査科
8	中四国ブロック血液センター	技術部 検査課	37	国立循環器病研究センター	臨床検査部 輸血管理室
9	関西医科大学附属枚方病院	輸血・細胞療法部	38	県立広島病院	臨床研究検査科
10	福岡赤十字病院	検査部 HLA検査室	39	高知医療センター	
11	岡山県赤十字血液センター	検査課	40	湧永製薬株式会社	試薬・診断薬事ビジネス課
12	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部	41	株式会社 リプロセル	技術部
13	株式会社 エスアールエル	品質保証部 品質保証企画グループ	42	北海道赤十字血液センター	検査部 検査三課
14	近畿ブロック血液センター	検査部 検査三課	43	東京女子医科大学	中央検査部 移植関連検査室
15	近畿大学医学部附属病院	輸血細胞治療センター	44	社会保険中京病院	検査部
16	香川県立中央病院	中央検査部	45	金沢医科大学病院	北陸腎移植 HLA 検査センター
17	九州ブロック血液センター	検査二課	46	山形県立 中央病院	輸血部
18	株式会社 ベリタス	技術営業部	47	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・細胞検査グループ
19	東海大学医学部付属病院	診療技術部 移植免疫	48	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部
20	広島大学病院	輸血部	49	国立病院機構千葉東病院	臨床検査科 HLA検査室
21	関東甲信越ブロック血液センター	検査部 検査三課	50	獨協医科大学病院	臨床検査センター 遺伝子・HLA検査室
22	松江赤十字病院	検査部	51	大分県立病院	輸血部
23	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部	52	熊本大学医学部附属病院	中央検査部
24	徳島大学病院	輸血部	53	三菱化学メディエンス株式会社	遺伝子分析研究部 細胞性免疫グループ
25	筑波大学	医学系技術室	54	Gen-Probe GTI ダイアグノステックス株式会社	企画開発
26	北海道大学病院	検査・輸血部	55	愛知県赤十字血液センター	検査一課
27	公立大学法人 横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部	56	富山大学附属病院	輸血・細胞治療部
28	岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部 免疫血清検査室	57	鷹揚腎研究所 弘前病院	化学実験室
29	大阪府立急性期・総合医療センター	移植支援検査センター			

2, 抗体検査結果解析

FlowPRA 法の検査状況の解析

東京女子医大 石塚 敏

Lab Screen による抗体検査

HLA 研究所 二神 貴臣

WAK Flow および ICFA 法による抗体検査

北海道ブロック血液センター 高橋 大輔

その他検査法およびクロスマッチ

中央血液研究所 中島 文明

3, 部門別解析および結果評価 (各参加部門における施設別結果評価)

DNA タイピング

中央血液研究所 田中 秀則

抗体検査

近畿ブロック血液センター 高 陽淑

5. QCWS サンプルの総合結果

参加各施設の精度管理, 技術向上に役立てることを目的に, DNA および抗体サンプルの総合結果を示す。DNA サンプルは, 本ワークショップで解析した結果に加え, 中央血液研究所で精査した結果を加味し, 総合的にリアサインした。HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 領域は, 1 本鎖 DNA に調製して塩基配列を確定し Ambiguity を回避した結果を示す。解析データベースは IMGT/HLA Database Sequence Alignments based on Release 3.7.0 (Jan-2012), 表記は本学会 HLA 標準化委員会のアレル表記法と結果報告の原則 (2010 年版 改訂 1.1 版) に従い記載した (表 2)。また, 抗体サンプルは, 抗体 QC 参加施設の総合判定結果を集計して, 3 分の 2 以上の参加施設が陽性判定した抗原をスコア「8」、陰性判定した抗原をスコア「1」、どちらも 3 分の 2 に達しない抗原をスコア「4」で示した。SH2402 は, IgM 性抗体のみの特異性で反応する抗原に「**」を記した (表 3)。

表 2 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート : DNA サンプルの総合結果

HLA-Class I	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
H2401	A*02:03:01 A203	A*24:02:01:01 A24	B*52:01:01 B52	B*56:01:01 B56	C*01:02:01 Cw1	C*12:02:02 Cw12 ※
H2402	A*11:01:01 A11	A*31:01:02 A31	B*46:01:01 B46	- -	C*01:02:01 Cw1	- -
H2403	A*02:06:01 A2	A*11:02:01 A11	B*38:02:01 B38	B*48:01:01 B48	C*07:02:01 Cw7	C*08:03:01 Cw8
H2404	A*02:01:01 A2	A*24:02:01:01 A24	B*15:05:01 B62	B*51:01:01 B51	C*07:02:01 Cw7	C*14:02:01 Cw14 ※
HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
H2401	DRB1*13:12:01 DRB3*02:02:01 DR13 DR52	DRB1*15:02:01 DRB5*01:02:01 DR15 DR51	DQA1*01:03 DQB1*03:01:01 DQ7	DQA1*05:03:07 DQB1*06:01:01 DQ6	DPA1*02:01 DPB1*05:01 DPw5	DPA1*02:02 DPB1*09:01 DPw9 ※
H2402	DRB1*09:01:02 DRB4*01:03:01 DR9 DR53	DRB1*12:01:10 DRB3*01:01:02 DR12 -	DQA1*03:02:03 DQB1*03:01:01 DQ7	DQA1*05:05:09 DQB1*03:03:02 DQ9	DPA1*01:03 DPB1*02:01:02 DPw2	DPA1*02:02 DPB1*05:01 DPw5
H2403	DRB1*04:10:01 DRB4*01:03:01 DR4 DR53	DRB1*16:02:01 DRB5*02:02 DR16 DR51	DQA1*01:02:08/09 DQB1*04:02:01 DQ4	DQA1*03:01:02/03 DQB1*05:02:01 DQ5	DPA1*02:02 DPB1*03:01 DPw3	- DPB1*05:01 DPw5
H2404	DRB1*08:02 DR8 -	DRB1*14:06 DRB3*02:02:01 DR14 DR52	DQA1*04:01 DQB1*03:01:01 DQ7	DQA1*05:03:07 DQB1*04:02:01 DQ4	DPA1*01:03 DPB1*02:01:02 DPw2	DPA1*02:02 DPB1*05:01 DPw5

上段 (斜体): HLA 遺伝子型
下段 (太字): HLA 型

※このアレルに対応するHLA型が判明していないためアレル名の第1区域で表記

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング Liminex 法—

石井 博之¹⁾

¹⁾ 近畿ブロック血液センター検査三課

1. 概況

Luminex 法の参加施設は、解答を寄せた 53 施設中、31 施設 (58.4%) あり、昨年と同じ施設数であった。使用されたキットは、ワンラムダ社製 LABType が 10 施設 (32.3%)、LABType HD が 7 施設 (22.6%)、湧永製薬製 WAKFlow が 17 施設 (54.8%)、医学生物学研究所製ジェノサーチが 6 施設 (19.4%)、ジーンプローブ社製 LIFECODES が 1 施設 (3.2%) であった。タイピング実施ローカスは、全施設が HLA-A, B を実施しており、その他 HLA-C (26 施設, 86.7%)、DRB1 (30 施設, 96.8%)、DRB3/4/5 (3 施設, 9.7%)、DQA1 (7 施設, 25.8%)、DQB1 (15 施設, 48.3%)、DPA1 (4 施設, 12.9%)、DPB1 (8 施設, 25.8%) の報告があった。

2. 解析方法

解析方法については、以下の 3 項目について解答のあった HLA-A, B, C, DRB1 を対象に行った。

- 結果の表記
- 反応データ
 - ① 陽性コントロールビーズ蛍光値の平均値とばらつき (%CV)
 - ② 各プローブの Pmin/Nmax 値 (P/N 値) の比較
 - ③ 各施設のカットオフ値の変更状況
- アサインミスとその原因

なお、詳細なデータについては、学会ホームページに掲載の「16 回 QC ワークショップ報告集」を参照されたい。ジーンプローブ社製 LIFECODES については、1 施設のみの参加であり、解析ソフトも使用できなかったため、反応データの解析は対象外とした。

3. 結果と考察

1) 結果の表記

Luminex 法における結果の表記については、同一キットの同一ロットであれば同じ結果表記になるはずであるが、ambiguity の記載がないもの、ambiguity の組み合わせが数字の小さいアリアル順になっていない等、例年見られる。原則に沿った結果の表記で報告することが望まれる。

2) 反応データ

陽性コントロールビーズ蛍光値の平均値とばらつきでは、HLA-C のエクソン 2 において %CV が 56% と大きな施設があった。当該施設の 4 検体 (H2401 ~ H2404) の内、H2402 のエクソン 2 陽性コントロールビーズ蛍光値が、159 (他の 3 検体の蛍光値は、2543, 2270, 2304) と非常に低く、増幅不良が考えられる。結果的には、正しいタイプで判定されていたが、増幅不良が明らかなデータで結果を出すのは、信頼性という意味では低く、問題があると考えられる。各プローブの P/N 値) の比較では、各ローカスとも良好であったが、HLA-DRB1 において P/N 値 3 未満のプローブが多く見られた施設があった。原因はプローブとの反応性が悪かったわけではなく、コンタミネーションが原因と考えられた (後述)。各施設のカットオフ値の変更状況では、今年度は約 7 割 (昨年度は約 3 割) の施設がカットオフ値の変更なく正しい結果で判定されており、全体的に反応性が良好であったことが伺える。

3) アサインミス

アサインミスについては、7 件 (HLA-A : 2 件, HLA-B : 2 件, HLA-C : 1 件, HLA-DRB1 : 2 件) あり、内 3 件 (No. 3, 4, 7) は反応データには問題なく転記ミ

スと考えられた。No. 1, 2 については、1つのプローブとの反応が偽陰性によるものであったが、原因となったプローブの反応性は特に問題となるようなデータではなく、慎重に判定すれば防げたアサインミスと思われた。No. 5 については、判定に苦慮するデータであり、コンタミネーションの疑いがあった。当該施設の報告された結果をもとに判定すると7個のプローブのカットオフ値を陽性から陰性に変更する必要があったが、変更したプローブの蛍光値はすべて高く、陰性とは考えられないデータであった。結果、2つのプローブの判定に誤りがあったが、基本的には判定できるデータではなく、再検査が必要であり、無理やり判定し、結果を出したこと自体に問題がある。このように特定のプローブの蛍光値が高い場合、別のアレルの存在も考えられる。これらのプローブの特異性を確認すると DRB1*08:02 の存在

が疑われ（当該検体の正しいタイプは、DRB1*04:10, DRB1*16:02/17/19）、コンタミネーションが原因と考えられた。Luminex 法は、反応させるプローブ数が多く、数個のプローブの判定をミスしても何らかのタイプがアサインされてしまう。そのため、各プローブの反応性を把握することが重要であり、特に蛍光値（LABType の場合は Normal Value）がカットオフ値付近のプローブの判定には注意が必要である。

4. まとめ

反応データについては、年々安定してきており、概ね良好であった。しかしながら、転記ミスやアサインミスの数については例年と変わらない状況であり、ミスのあった施設においては、もう一度データを見直し、ミスの原因や問題点を見つけ改善することが望まれる。

第16回 HLA-QC ワークショップレポート

第16回 HLA-QC ワークショップレポート — 検査法別解析 DNA タイピング SSO 法 (INNO-LiPA) —

安尾美年子¹⁾

¹⁾ 東京女子医大中央検査部移植関連検査室

1. はじめに

INNO-LiPA (SSO 法) は、昨年で最後となった RELI に代わるキットとして、同様の原理であることから使用する施設が増えているが、今回の QCWS の参加は4施設のみであった。解像度は低～中であり、RELI に比べて判定までの所要時間が長い。ストリップが薄いため多少扱い難く手間もかかるが、RELI に慣れた施設では導入しやすいと思われる。

2. 検査状況

4施設中1施設 (24D18) は H2401・H2402 のみのデータ提出であり、INNO-LiPA は SSP の補助としての使用であった。また、HLA-C・DRB3/4/5・DQB1 のデータ提出は1施設 (24D08) のみである。

3. 解析結果

3.1 クラス I

INNO-LiPA の判定は判定ソフトによるものと日本人を対象とした早見表によるものがある。判定ソフトではアレルの組み合わせにより ambiguity が異なるのに対して、早見表では4桁アレルにより ambiguity が固定されるが、同じ結果になる場合もある。

サンプル H2401・H2402・H2403 についてはどの施設も4桁レベルでの問題はなかったが、24D04・24D18 の

施設はとくにサンプル H2401 でバンドの発色が弱い部分が見られた。また1施設の表記法 (アレルが1つしか検出されない場合) の誤りと、判定ソフトのバージョンの違いのためか ambiguity が異なる施設があった。

H2404 については A ローカスには3施設とも判定に問題はなかった。しかし、B ローカスでは3施設とも2桁 (第1区域) レベルでは問題無いが、第2区域が判定ソフトの見方の違いと考えられる結果であった。

3.2 クラス II

DR ローカスは1施設のみが Decoder の使用により、DRB3/4/5 まで判定されていた。また同施設のみ DQ ローカスも提出されており、他施設とは比較できないが問題無い結果と考えられた。

DRB1 については1施設のみ H2401・H2404 で第1区域の判別ができない結果が記載されているが、原因はこれも判定ソフトの見方の違いと考えられる。

4. まとめ

サンプルが日本人由来のアレルであるため、日本人アレルとしては2桁レベルの誤判定はなかったが、判定ソフトの見方の違いにより、第1区域が決定できないと判断した施設があった。どのキットでも同様かも知れないが、日本人のアレルに限定しなければ第1区域の判定も困難であり、日常検査には対応できないと考えられる。

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング SSP 法—

藤井 明美¹⁾

¹⁾ 県立広島病院

1. 概要

SSP 法での参加施設は、27 施設（全参加施設 50%）であり、昨年度比較で 7 施設増であった。このうち、SSP 法単独参加は 18 施設、その他の方法との併用参加は 9 施設であった。なお、併用参加施設中 2 施設は「補助試薬として使用」と明記され、1 施設は報告内容から補助試薬使用と解釈されたため、SSP 法での解析および評価をおこなわないこととした。なお、結果の詳細は学会ホームページに掲載されているので、そちらを参照して

2. 参加部門

SSP 法の参加部門は、輸血関連、臓器移植または輸血関連と臓器移植両方での参加が造血幹細胞移植での参加施設に比して多かった。特に、臓器移植での参加施設では SSP 法単独参加が多い傾向にもあった。

3. 試薬

今回報告された使用試薬は低解像度（low resolution）試薬 4 種類、高解像（high resolution）試薬 3 種類であった。特に Micro SSP（OneLambda 社）の使用施設数が多く、とりわけ日本人向けに開発された低解像度（low resolution）試薬である Micro SSP JPN の使用施設は 19 施設と最も多かった。

4. 解析結果

解析は QCWS 部会からの解答（Consensus Allele）を

基に miss assign がないかをチェック、相対的反応データの不備（偽陽性 false positive・偽陰性 false negative）の有無を確認した。

1) 判定ミス（miss assign）

判定をミスの主な要因として、①反応が不備（偽陽性 false positive・偽陰性 false negative）であった場合、②表記方法が間違っていた場合があり、どちらでもない場合もあった。しかし、多くは②の表記方法の間違いによる判定ミスものであり、反応に関しては概ね良好であった。

2) 相対的反応データの不備

相対的に偽陽性（false positive）や偽陰性（false negative）があると思われた施設は 5 施設あった。しかし、miss assign していない施設もあり、入力間違いの可能性も中にはあると思われる。

5. まとめ

今回は、反応データに関しては概ね良好と思われる。しかし、SSP 法の参加施設の多くは低解像度（low resolution）試薬の使用であるため、第 2 区域表記では多くの Ambiguity が生じ、記載方法間違いでの判定ミスが多かったと思われる。本来、第 1 区域までの判定試薬である低解像度（low resolution）試薬を使用している報告には、かなりの困難が生じていると思われる、またこのことは結果の解析時にも同様である。SSP 法での使用試薬状況を加味した報告方法等、今後対応が必要になってくるかもしれない。

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング SBT 法—

重成 敦子¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部

1. はじめに (HP 掲載結果: 図 2)

SBT 法の参加施設数は 6 施設で, HLA-A, B, C, DRB1 座のタイピング結果は全施設から, HLA-DQB1, DPB1 座のタイピング結果は, 3 施設から提出された。使用されたキットは, AlleleSEQR HLA typing kits (CELERA) が 6 施設で, その中の 1 施設については SeCore Sequencing Kits (invitrogen) と併用していた。データ解析は, 全ての施設が Assign 解析ソフトを使用していた。

今回, すべての施設が, AlleleSEQR HLA typing kits (CELERA) と, Assign 解析ソフトを使用していた為, QCWS を行った時点での最新のリファレンス (IMGT/HLA3.7.0-12/04/2012) を使用し, Assign3.6+ で解析した結果を正解回答とした (図 1)。本レポートでは, 各施設で判定したタイピング結果の異なる部分に注目して解析を行った (図 3, 4)。

2. 解析結果と考察

Assign 解析ソフトにおけるリファレンスの更新ミスと, 第 1 区域アンビグエィティーにおける表記ミスが認められた。

2.1 Assign 解析ソフトにおけるリファレンスの更新ミス (図 6)

SBT 法のタイピングでは, データベースで頻繁にアレルの削除や新規登録が行われているため, 最新のリファレンスを使用してタイピングすることが必要である。

最新のリファレンスは, Conexio Genomics のホームページよりダウンロードすることが可能である。そのリファレンスデータを Assign 解析ソフトに取り込み, 解析を行う。このリファレンスの更新は, 解析ソフト購

入会社などからの通知はないため, それぞれ個人で確認し, 更新しなくてはならない。

このダウンロードしたリファレンスデータファイルには, IMGT-HLA データベースサイトのバージョン, 削除および新規登録のアレルの情報が含まれている。

2.2 表記ミス (図 7)

第 1 区域アンビグエィティーにおける表記では, H2404 の DRB1 のタイピングで allele1 の群が全て DR14 なのに対し, allele2 の群は, DR8 と DR13 が混在していることから, この場合の正しい表記は, 「HLA タイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則」の III (2) に相当するため, DRB1*08:02/13:47/+, DRB1*14:02/06/52/+ が正解となる。

さらに, AlleleSEQR HLA typing kits (CELERA) および, SeCore Sequencing Kits (invitrogen) の HLA-DRB1 のタイピングキットには, エクソン 2 Forward プライマー, エクソン 2 Reverse プライマー, Codon86 プライマーの 3 種類のシークエンスプライマーが添付されている (図 8)。この Codon86 プライマーは, DRB1 のコドン 86 番目の GTG モチーフのシークエンスプライマーである。

Assign 解析ソフトで解析する際に, コドン情報を設定 (図 9) することで Codon86 (GTG) プライマーで得られる配列の有無や, その配列情報により, アレルを絞り込むことが可能な場合もある。今回の QCWS のサンプルでは, H2404 が Codon86 の使用により, HLA-DRB1*08:02, -DRB1*14:06 とさらに絞り込みが可能である。

2.3 キットによる違い

今回の QCWS では, AlleleSEQR HLA typing kits (CELERA) と, SeCore Sequencing Kits (invitrogen) の 2 種類のキットでの報告があった。

2 種類のキットの解析可能ローカスは、いずれも HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 である (図 10)。対照とする解析領域は、ClassI の HLA-A, B, C はエクソン 2, 3, 4 領域で、ClassII の DRB1 はエクソン 2 領域、DQB1 はエクソン 2, 3 領域となっており、両キット共に同じ領域の配列を解析しているが、DPB1 の解析領域については両者で異なっている。

すなわち、AlleleSEQR HLA-DPB1 typing kits は、エクソン 2 領域のシークエンスプライマー (別に補足試薬を購入可能) のみなのに対し、SeCore DPB1 Locus Sequencing Kits は、エクソン 2, 3, 4 領域のシークエンスプライマーが含まれており、より長い領域が可能である。

そして、AlleleSEQR typing kits の補足試薬 (別購入) を使用しアンビグニティーを解消した施設があった。また、SeCore DPB1 Locus Sequencing Kits を使用し、アンビグニティーを減らすことに成功した施設もあった。

さらに、今回 H2402 の HLA-DPB1 座のタイピングで、SeCore Sequencing Kits を使用すると判定不能との報告があった (図 11)。H2402 の HLA-DPB1 座の得られたシークエンス配列を IMGT-HLA データベースサイトで解析したところ、新しく登録された HLA-DPB1*135:01 と既知の HLA-DPB1*02:01:02 のヘテロの配列と一致した。HLA-DPB1*135:01 は、今回の解析で使用した Assign のリファレンスでは、公認未決定 (Pending) の段階で含まれていなかったが、その後、新たに IMGT データベー

スで公開されたアリルだった。

このように、新しい HLA アリルが次々と同定、登録され、順次公開が行われているので、SBT 法では最新のリファレンスを確認し使用することが必要である。

また、H2402 の DRB1 タイピングでは、SeCore DRB1 Locus Sequencing Kits を使用し、Assign のソフトで解析を行う場合、エクソン 2 領域前半部分のシークエンス配列は綺麗に読めているにもかかわらず、プライマーの位置が正しく認識されずアンビグニティーとなった施設もあった。Assign のソフトのバージョンによって、プライマー位置を変更できずアリルの絞り込みが出来なかったと考えられる。

3. まとめ

今回の不正解の主な理由は、表記ミスとリファレンスの更新ミスであった。正確で精度の高い解析が出来たとしても、正しく表記し報告することが必要である。また、必要に応じて補足試薬などを使用し、アンビグニティーを減らすことも考慮しなければならない。

SBT 法を行う際には、綺麗なシークエンスデータを得ることを心がけ、リファレンスとアンビグニティーの表記に注意する必要がある。さらには、QC ワークショップに積極的に参加することで、施設の精度を保持できると思われる。

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート
—DNA タイピング 表記法について—橋口 裕樹¹⁾¹⁾福岡赤十字病院

1. 概要

今回、第 16 回 QCWS の参加施設は 53 施設であり結果の表記は A, B, C, DRB1 を評価対象とし DRB3/4/5, DQB1, DPB1, DQA1, DPA1 は評価対象外とした。ローカス別の参加数は A, B が全 53 施設 (100%), DRB1 は 52 施設 (98.1%), C は 41 施設 (77.4%) であり、昨年と比べ僅かに増加傾向であった。

今回の解析も学会が規定する表記法 (HLA タイピング結果のアリル表記法と結果報告の原則 (2010 年度版), 改訂 1.1 版) をもとに評価を行った。表記法, 改訂 1.1 版の主な改訂箇所を下記に示す。また, 表記法の詳細は, 学会のホームページを参照して頂きたい。

1) 改訂箇所 (1)

「II. アンビギュイティ (ambiguity) の結果表記について」の「2. 第 2～4 区域で判別できないアリルが複数存在する場合の表記」について, 以下の改訂を行う。

第 2 区域で判別できないアリルが複数存在する場合, 最も数字の小さいアリルを最初に記し, その後に「/ (スラッシュ)」を入れ, 判別できない他のアリルの第 2 区域の数字を小さい順に記す。「/ (スラッシュ)」で表記するアリルは, 最大 3 種類までとし, 4 種類以上の場合, 最後に「+ (スラッシュ, プラス)」を付記する。

2) 改訂箇所 (2)

「IV. 血清学的 HLA 型の結果表記について」, 複数の HLA 型表記について, 以下の内容を追加する。

DNA タイピング結果から複数の HLA 型の可能性がある場合, 最も数字の小さい HLA 型から順番に記し, 各 HLA 型は「/ (スラッシュ)」区切る。

例: HLA-DRB1*04:03/05/06/+ と判定された場合は, 「HLA-DR4」と表記し, HLA-A*02:06/10/21/+ と判定さ

れた場合は, 「HLA-A2/210」と表記する。

今回のサンプル H2401 を使った表記例は, 以下のとおり。

- A*02:01/02/03/+ と判定した場合は A2/203 と表記する。
- A*02:03 と判定した場合は A203 と表記する。
- A*24:02/03/04/+ と判定した場合は A24/2403 と表記する。
- A*24:02 と判定した場合は A24 と表記する。

3) 改訂箇所 (3)

「IV. 血清学的 HLA 型の結果表記について」, HLA-C 座の HLA 型表記について, 以下の内容を追加する。

WHO 命名委員会と日本組織適合性学会 HLA 標準化委員会の何れでも HLA 型が不明な場合は, 第 1 区域で分類される HLA 型で表記する。また, HLA-C 座のアリル HLA-C*12 から C*18 に対応する HLA 型は公認されていないが, 第 1 区域を用いて HLA 型とする。これらの場合, 備考欄に「このアリルに対応する HLA 型が判明していないため, アリル名で表記している」等の説明を付記してもよい。

表 1 主な DNA 型表記での減点対象例

ambiguity の表記が不正確 (-15)	A*24
“L” を付記 (-15)	A*24:02/02L/03/+
“N” を付記 (-15)	A*24:02/09N/10/+
“:” コロンなし (-5)	A*2602
ローカス名の表記なし (-5)	24:02/03/04/+
“*” の表記なし (-5)	24:02/03/04/+
“*” が全角 (-5)	DRB1 * 15
判定不能表記が “undefined” でない (-5)	判定不能
Blank の表記 (-5)	A*—
小さい順に表記されていない (-10)	DRB1*14:54/01/02/+

表2 主なHLA型表記での減点対象例

表記が不正確 (-10)	B15
小さい順に表記されていない, /の後のローカス名が不要 (-10)	B62/B15
小さい順に表記されていない, ()の表記 (-10)	B62 (B15)
第1区域を用いて表記していない (-10)	Cw12をblankや -を記載
判定不能表記がundefinedでない (-5)	判定不能
“DRB”と表記している (-10)	DRB1
“*”を表記している	Cw14*

2. 結果

DNA表記, HLA表記ともに多くの施設でA(正解)

若しくはB(不備がある)であったが, 数施設においては表記に誤りがあり, 大きな減点対象となった。

3. 考察

今回は, DNAタイピング結果から複数のHLA型の可能性がある場合, 最も数字の小さいHLA型から順番に記す表記方法での誤りが多かった(改訂箇所(2))。この点を次回, 表記する時に特に注意して頂きたい。また減点となった施設は, 再度“HLAタイピング結果のアリル表記法と結果報告の原則(2010年度版)”を熟読されて, 正しい表記での報告をお願いしたい。

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 FlowPRA 法—

石塚 敏¹⁾

¹⁾ 東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室

1. 概要

FlowPRA 法は、全施設から Negative Control・Positive Control およびサンプルの FCS ファイルの提出をお願いし、FCS データ解析ソフト (FlowJo : Tree Star, Inc. USA) で統一した条件設定による解析を行った。各施設から報告があったデータの解析方法は、判定保留を除外し、各施設の判定スコアから陽性率・陰性率、一致率を求めた。FlowPRA 法の検査状況の解析について詳細な集計データ等は、紙面の都合上、学会ホームページに記載されている概要資料を参考にして頂きたい。

2. FlowPRA 法の検査状況

FlowPRA Screening IgG test の実施施設は、HLA Class I 抗体 : 19 施設・HLA Class II 抗体 : 18 施設 (内訳は、輸血関連 9・臓器関連 16・造血関連 5 : 重複施設を含む) であった。

FlowPRA Screening IgM test の実施施設は、HLA Class I 抗体 : 2 施設 (内訳は、輸血関連 2・臓器関連 2・造血関連 2 : 重複施設を含む), HLA Class II 抗体 : 2 施設 (内訳は、輸血関連 2・臓器関連 2・造血関連 2 : 重複施設を含む) であった。

FlowPRA Single Antigen IgG test の実施施設は、HLA Class I 抗体 : 3 施設・HLA Class II 抗体 : 3 施設 (内訳は、輸血関連 2・臓器関連 3・造血関連 1 : 重複施設を含む) であった。

使用機器は、ベクトン・ディッキンソン : 11 施設・ベクマン・コールター : 8 施設であった。

3. FlowPRA Screening IgG test 解析結果

配布された 4 種類の Sample は、HLA Class I IgG 抗体

が SH2401・SH2403・SH2404 において陽性であり、SH2402 は陰性であった。

参加施設から報告して頂いた判定スコアの一致率は、SH2401 : 100%・SH2402 : 84.2% (判定保留 : 2 施設・偽陽性 : 1 施設), SH2403 : 100%・SH2404 : 84.2% (偽陰性 : 2 施設・判定保留 : 1 施設) であった。

HLA Class II IgG 抗体は、SH2401・SH2404 において陽性であり、SH2402・SH2403 は陰性であった。一致率は、4 種類の Sample すべてにおいて 100% であった。

陽性率 % は、HLA Class I & II 抗体共に最大・最小値についての施設間差が大きい結果であった。

データ提出用ファイルに添付されているヒストグラム、また FCS ファイルからの再解析結果を参照すると、各施設の Negative Control ヒストグラムの波形や設定位置に若干の相違が認められた。また、ヒストグラム等のデータから確認することが出来ない使用機器の初期設定や Anti-Human IgG-FITC の力価等を確認して頂きたい。

各施設の FCS ファイルから Control Beads を解析すると、1 施設 SH2401 と SH2403 において Gate 内に HLA Class I Beads の混入が認められた。しかし、SH2402 と SH2404 において問題がないことから Sample の前処理が均一でない可能性が考えられた。

4. FlowPRA Screening IgM test 解析結果

配布された 4 種類の Sample の判定スコア一致率は、HLA Class I IgM 抗体で SH2401 : 50%・SH2402 : 100%・SH2403 : 100%・SH2404 : 50% であり、HLA Class II IgM 抗体は、4 種類の Sample すべてにおいて 100% であった。

結果の乖離を示した HLA Class I IgM 抗体の SH2401・SH2404 について、データ提出用ファイルに添付されているヒストグラム等を参照すると、乖離の原因は Nega-

tive Control にある可能性が考えられた。IgM 抗体に対するメーカー純正の Negative Control serum は現在販売されていない。そのため、メーカー純正の IgG 抗体用である Negative Control serum を使用する場合は、使用 Lot. ごとに IgM 抗体の有無をチェックする必要がある。

5. FlowPRA Single Antigen IgG test 解析結果

データ提出用ファイルに添付されているドットプロット、また FCS ファイルからの再解析結果を参照すると各施設のドットプロットによる図にはほぼ相違がなかった。しかし、各施設によって Cut-off の設定基準が大き

く異なっているのが現状であり、設定基準によって結果の乖離を生じていることが把握出来た。

6. まとめ

今回の解析結果から FlowPRA Screening では、陽性率 % における最大・最小値について施設間差を小さくする統一化プロトコルが必要であると考えられた。

また、FlowPRA Single Antigen test においても、各施設のドットプロットによる図にはほぼ相違はないことから Cut-off の設定基準を統一化する検討が必要であると考えられる。

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 LABScreen による抗体解析—

二神 貴臣¹⁾

¹⁾ 公益財団法人 HLA 研究所

1. はじめに

LABScreen を実施した施設は 21 施設（輸血：14, 臓器：13, 造血：13, その他：1）であった。スクリーニングのみを実施した施設は 1, Mixed・Multi・PRA のいずれかを用いたスクリーニングの後に Single Antigen (SA) で同定を実施した施設は 9 施設, SA で同定のみを行った施設は 11 施設であった。スクリーニング検査に Mixed を用いた施設は 6 施設で, PRA は 4 施設, Multi を用いた施設も 1 施設あった。判定は 1 施設（自家製）を除きすべての施設で HLA Fusion が使用された。

2. 結果の解析および考察

2.1 判定の不一致

抗体有無の判定について Class I では SH2402, Class II では SH2402 と SH2403 に乖離が見られた。SH2402 Class I では 14 施設が陰性と判定したのに対して, 陽性と判定した施設が 6 施設, 保留とした施設が 1 施設あった。SH2402 Class II では陰性：14 施設, 陽性 3 施設, 保留 2 施設であり, SH2403 Class II では陰性 16 施設, 陽性 2 施設であった。乖離の原因としては cutoff の施設間差や Baseline Normalized Value (BNV) の施設間差によるものと考えられる。

2.2 cut off の設定について

ほぼ全ての施設が HLA Fusion を使用して判定をしているが, cut off の設定は施設により様々であった。BNV500～1,000 を cutoff としている施設が多いが, Threshold (しきい値) を cutoff としている施設もあるように見られる。また, cutoff 値を参考に総合的に判定している施設もあった。このような cutoff の設定の違いのため, ある施設では BNV900 を陰性とし, 別の施設では BNV600 を陽性とするケースがいくつか見られた。

2.3 実測値のバラツキ

各施設の Positive Control Beads を比較すると施設毎に大きく差があることがわかる。もっとも大きな差があるところでは BNV にして 10,000 程度差があった。また, 陽性反応の beads だけを集め, その平均値を比較したところ, 大きな差が見られ, 昨年の QCWS と同様であった。施設間のバラツキは検体の前処理方法や洗浄の仕方など技術的な要因や施設の環境に影響しているものと考えられる。

2.4 その他の判定不一致

その他の判定不一致には記載ミスがあった。日常検査においても QCWS 同様に手動で入力している施設は, 入力の際には細心の注意を払う必要がある。他の判定不一致の要因としてコンタミが疑われる例が 2 例あった。コンタミ防止は検査時に最も気をつけなければならない技術的問題であり, 当該施設は自施設の検査手順を見直し, 必要に応じて改訂する必要があると考える。

3. まとめ

LABScreen による HLA 抗体スクリーニングの結果には施設間でいくつかの乖離がみられた。乖離の原因は検体の前処理方法や検査手技に起因する実測値のバラツキと cutoff の設定の違いによるもので, 弱陽性抗体の判定に影響した。強陽性抗体についてはいずれの施設も検出していた。実測値についてはある程度のバラツキは仕方がないが, 他の施設よりも大きく差があった施設については検査手順等を見直す必要があるかもしれない。判定の際には cutoff のみに捉われず交差反応やエビトープを考慮に入れて総合的に判定するとより精度の高い判定が可能になる。また, SA はリコンビナント抗原を用いているため, 細胞には反応せず, SA にのみ反応する抗体も検出することがある。臨床的に意義のある抗体かどうかを見極めるためにも PRA などの細胞由来 HLA 抗原を用いた検査との併用が望ましいと考える。

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート
—検査法別解析 WAK Flow および ICFA 法による抗体検査—高橋 大輔¹⁾¹⁾北海道ブロック血液センター

1. はじめに

WAKFlow HLA 抗体検出試薬（以下 WAKFlow MR）での参加数は、クラス I で 10 施設、クラス II で 6 施設、ICFA で 5 施設であり例年とほぼ変わらなかった。参加施設の大半は血液センターであった（Table 1）。クラス I の試薬ロットは、M0A が 1 施設のみで、それ以外の施設は L0B の使用であった。何らかの血清処理を行っている施設が 7 施設、未処理が 3 施設であった。クラス II の試薬ロットは、L0A が 3 施設、L0B が 2 施設、K0B が 1 施設であった。また、すべての施設で何らかの血清処理を行っていた（Table 2）。

解析結果の詳細は、学会ホームページ「第 16 回 QC ワークショップ報告集」の HLA 抗体「WAKFlow および ICFA 法による解析結果」を参照されたい。

2. WAKFlow-MR クラス I

2.1 ビーズ反応性の比較

同一ロット内での血清処理の有無によるバックグラウンドビーズ（BB）とポジティブビーズ（PB）の蛍光強度に差を認めなかった。しかし、ロット M0A を使用した施設では、他の施設と比較して高い蛍光強度を示しており、試薬のロット間差の可能性が考えられた（Fig. 1）。また、配布血清の BB、PB の蛍光強度を施設別にみると、PB において施設番号 S04 と S17 で高い値を、S05 では低い値を示す傾向にあり、施設間差が示唆された（Fig. 2）。

2.2 サンプルごとの反応性について

HLA 抗体スクリーニング（抗体の有無）の結果は、全施設で一致した。Table 3–6 に各施設の抗原毎の判定結果の一覧を示すが、メインとなる特異性の判定はいずれの施設も一致が認められた。しかしながら、一部の抗

原では施設間で陽性、陰性の判定に不一致を認めた。Fig. 3–6 に施設ごとのビーズの反応性と設定したカットオフ値の範囲、施設間で判定の異なったビーズを示す。グラフに示されるように、Index 値がカットオフ値付近にあるビーズは、陽性・陰性の判断が難しく施設間差も大きくなり、このことが施設間の判定の不一致につながっていると考えられる。

各施設が設定したカットオフ値に基づくビーズごとの Index 値をスコア化し、セログラフを作成した（Fig. 7–11）。セログラフ解析の結果から、WAKFlow-MR はメインとなる抗体の特異性、および許容抗原の判定に十分な性能を有していると考えられた。しかし、C ローカスの特異性を含む血清 SH2403、2404 において、一部の C ローカス抗原に対する抗体を検出することができなかった（Fig. 10, 11）。

2.3 施設間での結果の不一致例について

結果の不一致例を Fig. 12–16 に示す。不一致例の多くは、カットオフ値付近の反応性の解釈に施設間差が生じたために起こっていた（Fig. 12）。このような、カットオフ値付近の反応性の解釈が困難な場合は、抗体の交差反応性やエピトープを考慮することで精度を上げることが可能かもしれない。また、記入ミスと思われる例や、勘違いと考えられる例も散見された（Fig. 13–15）。特定のロットを用いた施設において、ビーズの異常反応による判定結果の相違がみられており、試薬のロット差による非特異的な反応が示唆された（Fig. 16）。

3. WAKFlow-MR クラス II

HLA 抗体スクリーニング（抗体の有無）の結果は、1 施設において不一致を認めた。また、クラス I 同様に抗原ごとの判定結果の一部にも不一致を認めた（Table

13)。これらの不一致は、いずれもカットオフ値付近のビーズの判定が施設間で異なっているためと考えられた (Fig. 17, 18)。

4. ICFA 法

ICFA 法の参加施設はクラス I で 5 施設、クラス II で 1 施設の参加であった。評価可能パネルはクラス I で 4 ~ 25 パネル、クラス II で 4 パネルであった。

ICFA 法は各施設での使用パネル数や種類によって精度に大きく差が出てしまうことから抗体特異性の同定が難しく、施設間の評価は困難であった (Table 14)。

ICFA 法で提出された全結果について、Index 値をスコアリングし、セログラフによる血清の解析を行った (Fig. 22-24)。血清 SH2401 の解析結果から、ICFA 法は LABScreen Single Antigen (以下 LS-SA) で少なくとも BNV が 5,000 程度の抗体は十分検出可能であった (Fig. 22)。しかしながら、血清 SH2403 は、LS-SA で Cw9, 10, 1, 14 といった特異性を認めているのに対し、ICFA 法では Cw1, Cw14 を判定できるパネル全てに反応を認めなかった (Fig. 23)。同様に、血清 SH2404 についても LS-SA で Cw5, Cw8 の特異性を認めたが、ICFA 法では、Cw5 については確認可能なパネルすべてで陰性となり、SH2403 同様に C ローカスに対する抗体の一部が検出困難であった (Fig. 24)。

5. まとめ

WAKFlow-MR による HLA 抗体スクリーニング (抗体

の有無) 結果は、クラス II で、1 施設に不一致を認めたものの、概ね良好であった。抗体特異性の判定についても、概ね良好であったが、一部の抗原では施設間の不一致を認めた。この原因として、カットオフ値付近で反応しているビーズの解釈が施設間で異なっていることが挙げられる。WAKFlow-MR では、抗体が広範囲に及んでいる場合や IgM 性の抗体を保有する場合、陽性、陰性の境界が不明瞭となり、適切なカットオフ値を設定するのが困難となるケースが多い。そのため、ビーズの反応性を総合的に判断しながら抗体特異性、あるいは許容抗原を決定することが非常に重要であろうと考えられる。WAKFlow-MR クラス I は血小板輸血不応の原因となる抗体を十分に検出しようと推察される。しかし、今回の血清でもみられたように、C ローカスに対する抗体を検出できない場合もあるため、結果の判断には注意を要すると考えられる。

ICFA 法は、参加施設、パネル数が少ないことから施設間での評価は困難であったものの、セログラフ解析の結果から、ICFA 法は LS-SA で少なくとも BNV が 5,000 程度の抗体は検出可能であり、細胞を用いたクロスマッチには有用と考えられる。しかし、WAKFlow-MR クラス I 同様に、LS-SA で BNV が 15,000 以上の C ローカスに対する抗体を検出できない例を認めており、C ローカスに対する抗体の有無の判断には注意が必要と考えられる。

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 その他検査法およびクロスマッチ—

中島 文明¹⁾

¹⁾ 中央血液研究所

1. その他検査法

近年の HLA 抗体検査は圧倒的に FlowPRA や LABScreen が用いられている。必然的に本項で解析される「その他検査法」は LCT や LIFT などセル・ベースの検査法となる。LCT (AHG-LCT) 2 施設, LIFT1 施設, MPHA4 施設の参加であった。総合判定の抗体検出状況は、どの方法も問題ないように見えるが、複数方法の併用でカバーされているに過ぎない。また、抗体特異性について、LIFT 以外は厳しいといわざるを得ない。理由は明確で、抗原種類が少ないことが原因である。このような状況で HLA 抗体特異性を求めることは不可能であり、結果報告も困難である。

しかしながら、これらのセル・ベース・アッセイはクロスマッチに欠かせない技術である。さらに、高感度試薬の過剰反応を見分ける手段ともなる。今後も、高い技術水準の維持を期待する。

2. クロスマッチ

クロスマッチは本年から募集参加とし、ダイレクトクロスマッチと仮想クロスマッチで実施した。昨年と比較し、ダイレクトクロスマッチが 9 施設から 13 施設、仮想クロスマッチが 6 施設から 11 施設へと増加した。

ダイレクトクロスマッチは、指定する抗体サンプル (SH2401) と各施設が準備する抗原細胞で実施し、LCT4 施設, LIFT5 施設, ICFA9 施設の参加であった。

判定結果のグレーゾーン部分を解析すると、SH2401 の B35 特異性は、LABScreen Single で BNV 値 1,500 程度であり、ICFA クロスマッチでは Index 値 2.0 前後を示した。同様に、A24 特異性は LABScreen Single で BNV 値 6,000 程度の比較的強い反応を認めるが、LIFT では、ほとんど反応しない。こちらは、QC サンプル選定時に事前調査しており、A24 特異性は HLA 分子上の $\alpha 1$, $\alpha 2$ ドメイン以外のエピトープを認識していることが判明している。どちらのケースも、異なる方法による感度差の問題というより、各検査法の適切なカットオフ設定が要求される。また、このような抗体特異性が臨床意義をもつ抗体であるか検証することが重要と考える。

仮想クロスマッチは抗体サンプル (SH2401) に対して、二つの HLA 型 (H2401, H2403) を指定した。残念ながら、当初予定したセル・ソースが培養不良のため差替えとなり興味深い組合せとならなかった。抗体特異性が明確なため、各施設とも結果に問題は生じなかった。今回の QC ワークショップの参加状況では、仮想クロスマッチ参加の 11 施設以外に、15 施設が DNA-QC と抗体 QC に参加しているので、次年度以降の参加を望みたい。仮想クロスマッチは、データ自体も仮想化して行うことは可能である。しかし、QC ワークショップとして意味合いを持たせるには、やはり、実データでのマッチングは欠かせない。このことで、マッチングの考え方の根拠となる、HLA 型と抗体測定精度向上も兼ねることが期待される。

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLAQC ワークショップレポート —部門別解析 DNA-QC および結果評価—

田中 秀則¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

1. はじめに

DNA-QC 用の試料については、QCWS 部会で協議した「日本人由来の細胞で高頻度に検出される HLA 型（アレル）であること」、「日本人由来で稀な HLA アレルであること」の要件に合う細胞から抽出した DNA を配付した（表 1）。

DNA-QC への参加希望施設は、53 施設であり、昨年の参加希望施設（56 施設）より減少した。臓器移植部門 37 施設、輸血部門 24 施設、造血幹移植部門 19 施設、その他が 7 施設であり、うち 22 施設で重複がみられた（図 1）。

以下に部門別解析および各施設の結果評価について概説する。本文中の図表については、誌面の都合により、学会ホームページに掲載しているのので、そちらをご参考にして頂きたい。

2. 使用タイピング法について

SSO 法（Luminex）は、臓器移植部門以外で一番多く使用されており、また、臓器移植部門では SSP 法の使用比率が、54.1% と一番高かった（表 2）。また、各タイピング法の参加部門別の占有率は、臓器移植部門で SSO 法（INNO-LiPA）が 100% を占めていた（表 3）。

各タイピング法で、タイピング対象となった HLA ローカスを表 4 に示した。何れのタイピング法においても、HLA-A, B, DRB1 座は 100% 実施されていたが、HLA-C 座については、臓器移植部門の SSO 法（INNO-LiPA）使用施設（4 施設）での実施率は 50% と低かった。また、HLA-DRB3/4/5 座及び HLA-DQB1 座の HLA タイピングは、SSO 法（Luminex）及び SBT 法での実施率は低い傾向にあり、SSP 法及び SSO 法（INNO-LiPA）で高い傾向にあった。

3. 結果評価

3.1 概要

DNA-QC 参加施設から提出された結果の評価については、一昨年は試行的に実施し、昨年より統一した「HLA-QC ワークショップ結果評価の基準」に基づき行っている。QCWS 結果は、①判定結果、②結果表記、③試験・検査状況の 3 項目について評価し、各施設に報告を行った。

3.2 判定結果の評価

「HLA-QC ワークショップ結果評価の基準」の判定結果の評価として、「各 HLA タイピング法での判定結果が妥当であること」、「各 HLA タイピング法の判定結果と総合判定結果に齟齬がないこと」について、各タイピング法別、検体別、タイピング実施座別に、両方の基準に適合している場合を 60 点、何れか片方が適合しない場合は 0 点と採点し、最終的には各評価点の平均点をその施設の評価点とした。

今回の QCWS の「判定結果」の評価点は、平均で 56.5 点（図 2 参照）であり、昨年の 54.8 点より高くなった。タイピング法別では、SSO/SSP 法での評価点が、14th QCWS では 57.3 点、15th QCWS では 53.4 点であったのに対して、16th QCWS では 56.5 点であった。15th QCWS では、SSO/SSP 法のような低解像度のタイピングでの結果表記に問題があり、今回は一部改善されたものの、低解像度で表記法について、明確にすることが必要である。

3.3 結果表記の評価

昨年、当学会標準化委員会では、結果の表記法について以下 3 点の改訂を行った。

①第 2 区域で判別できないアレルが複数存在する場合

の表記する順番について

- ② DNA タイピング結果から複数の HLA 型の可能性
がある場合の結果表記法について
- ③ HLA-C 座の HLA 型が不明な場合 (HLA-C*12 ~
C*18) の HLA 型表記について

結果表記の評価基準は、「表記法に従って記載されている」ことを評価基準としており、適合している場合を 40 点とした。今回の QCWS 参加の平均点は 38.7 点 (図 3 参照) と、前回の QCWS の平均点 (38.5 点) を上回った。

3.4 試験・検査状況の評価

試験・検査状況の評価については、「HLA タイピング実施時に得られた試験結果 (データ) が適切であること、また判定が適切に行われていること」を評価しており、①試験結果が全て妥当である場合を“A”, ②反応データの一部に不備がある場合を“B”, ③反応データのほとんどが不備である場合を“C”と判定している。各方法別の評価結果の分布を表 5 に示した。SSO 法 (INNO-LiPA) 使用施設で“B”として評価された割合が高くなった。

4. 総合評価

「判定結果の評価点」と「結果表記の評価点」の合計点を総合評価とし、その評価点の分布を図 4 に示した。平均点は 95.3 点であり、昨年平均点 92.8 点を上回った。総合的な判定区分として、判定結果と結果表記の評価点の合計から、100 点を“A:良好”, 60 ~ 100 点未満を“B:要確認”, 0 ~ 60 点未満を“C:要改善”と区分して評価した。A 評価が 26 施設, B 評価が 27 施設, C 評価が 0 施設となり、“C:要改善”と評価された施設数が、初めて 0 となった (図 4)。

14th QCWS 以降、各施設別の評価点数の変動について検討を行うため、各施設の了承を得て 45 施設の評価結果を連結し、検討を行ったが、特に施設特異的な評価点数の変動は見られなかった。

また、各 QCWS での評価点の推移を図 5 に示した。14 ~ 16th QCWS での最低点は、年々上がって来ており、QCWS 評価点数が均一化している傾向にあった。

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —部門別解析および結果評価（抗体部門）—

高 陽淑¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

1. 概要

抗体検査の参加は、輸血部門 22 施設、臓器移植部門 23 施設、造血幹細胞移植部門 15 施設（全て重複あり）で昨年（15th）より 1 施設少ない 37 施設であったが、部門別参加の割合および参加施設の構成比率については大きな変動はなかった。

また、抗体検査実施状況については、37 施設中 34 施設が蛍光ビーズ法を応用した方法を実施し、使用試薬の目的調査から、抗体検出には FlowPRA が 18 施設、LABScreen が 14 施設、WAKFlow が 9 施設で用いられたことが判明した（重複あり）。さらに使用試薬の詳細を確認すると、抗体検出の検査の際に LABScreen single antigen も使用していた 8 施設中、5 施設は他施設との結果に相違を認めた。このことから抗体有無を検出する際には試薬の選択が重要であることが窺える。

また、ここ数年の傾向と同様に試薬の使用状況が特定の部門に偏らない「均一化傾向」を認めた。

2. 部門別解析

全部門での総合判定から抗体検出（抗体有無）結果の一致率を見た。昨年（15th）は 4 検体すべてクラス I, II ともに一致率が 97% 以上と非常に高かったが、本年は 83.0%～100% と一致率にバラツキを認め、SH2402 については Consensus が得られなかった。但し、この原因については検体が IgM 抗体の特異性を有するものであったことが原因であり評価点の採点対象にはならなかった。

総合判定結果部門別に、抗体特異性同定の部門別実施率（実施数／部門別参加数×100）を比較すると、Class I 抗体では実施率の高い部門から順に、造血幹細胞移植部門 86.7%、輸血部門 86.4%、臓器移植部門 65.2%、

Class II 抗体では造血幹細胞移植部門 73.3%、輸血部門 63.6%、臓器移植部門 60.9% となり、輸血部門の実施率が低かった昨年（15th）の結果とは異なる傾向を認めた。

3. 結果評価

3.1 抗体 QC 結果評価に対する考え方

今年度においても考え方は昨年（15th）と同様で参加施設から提出された結果が共通となる割合を表した「基準値＝現段階では 0.67（2/3）」を基に、それ以上の構成比率を示す抗原（あるいはサンプル）を対象として実施した。よってそれ以下の構成比率を示す抗原（判定結果が施設間でまとまらない抗原）は対象外となる（本年は SH2402 のクラス I 抗体についてはすべてが対象外）。その他、詳細な評価点基準設定の根拠および算出法については HP 掲載の解析結果を参照されたい。

3.2 評価内容

1) 抗体検出について A 評価（80 点以上）が 32 施設（86.5%）、B 評価（40～80 点未満）5 施設（13.5%）となり昨年の成績と比較すると若干の低下がみられた。今回は、SH2404 が Cw8+Cw5 の特異性であり、スクリーニングに用いた抗原パネルの不足が原因で抗体検出できなかった施設、また抗体スクリーニングに LABScreen single antigen を用いたことで他法では検出されない微弱的な反応を抗体陽性として判断した施設があったことが原因であると考えられる。

2) 抗体特異性同定検査を実施した 27 施設中、評価 A が 21 施設（77.8%）、評価 B が 3 施設（11.1%）評価 C（40 点以下）が 3 施設（11.1%）となり、抗体検出とは逆に昨年より評価 A の施設が増加し、B の施設が減少するという良い結果であった。これを部門別に解析すると、部門別平均評価点は造血幹細胞移植部門（38.9 点）>臓

器移植部門 (36.8 点) > 輸血部門 (33.0 点) で、3 部門では造血幹細胞移植部門が最も良好な成績となった。同様にサンプル別に部門ごとの平均点を比較してみたが、サンプルに偏りはなく全体的に輸血部門の平均点が低いことが判明した。

3) 今回、評価の対象となる抗原は各サンプル共に Class I 42 抗原 Class II 23 抗原、そのうち Class I 42 抗原について未検査 (抗原パネル不足) が存在するのは 7 施設 (特異性同定を実施した 27 施設の 25.9%) であった。7 施設の内訳を詳細にみると、1 施設は 1 抗原限定の未検査であったが 4 施設は抗原の未検査率が 42% ~ 78.6% と高く、さらに全施設が輸血部門での参加であった。Class II での未検査は 1 施設のみで、未検査率は 65.2% と過半数を占めており、なおかつ Class I で未検査率の高かった 4 施設のうちの 1 施設であった。

4) 抗体特異性同定検査の共通となる結果 (Consensus Result) を比較対照として、各施設の結果の一致状況を検討した。結果が不一致となるパターンは、Consensus Result が Score 1 であるのに対して Score 8 である場合 (暫定的に偽陽性とする)、その逆で、Consensus Result が Score 8 であるのに対して Score 1 である場合 (暫定的に偽陰性とする) の 2 通りを比較すると、全体的に偽陽性のパターンが多い傾向にあった。抗体特異性同定まで行った 27 施設中 21 施設 (77.7%) は LABScreen あるいは FlowPRA の single antigen を用いていることから、低い MFI の領域 (1,000 以下) での判定基準が統一化されていないこと、各抗原の反応性が明らかな陰性でなければ Score 8 と判定する傾向があることなどが要因として推測された。また、判定そのものが不安定である施設も存在するので、不一致率の高かった施設においては再確認を願いたい (詳細は HP 掲載の解析結果を参照)。

4. 結語

16QCWS の結果を総合的に判断すると、15QCWS から引き続き、参加施設の努力によって全体的な水準は維持されていると考えられた。ただし、C ローカス抗体の検出や未検査率の低減を目指すのであれば、採用する検査法の再検討が必要であろう。

また、改めて再認識が必要と思われた事項として、以下の 3 点が挙げられた。

① 抗体を検出した際には IgG/M に係らず、総合判定の Score は 8 (抗体は有り) とすること。

② 抗体の検出 (抗体有無) を実施する際には、その用途に応じた試薬を用いるべきであり、同定検査で用いる Single antigen は妥当ではないこと。

③ 抗体 QCWS で用いる Score は一般的に用いられるように反応性の強弱を表す数値ではない。あくまでも「陽性 = 8」, 「陰性 = 1」, 「未検査 = 0」のいずれかであり、任意の抗原との反応性が陰性ではないが、判定用パネルの抗原の重複状態から「陽性 = 8」という確証がとれないケースについてのみ「保留 = 4」という Score になること。

次年度以降の抗体 QCWS に参加する際には、時間と労力を駆使して出した結果が正当に解析されるためにも上記に挙げた事項について再認識して頂きたい。その上で、自施設での検査結果の精度および判定基準等について再確認し、その到達度を自己評価することができれば QCWS に参加したことが非常に有意義なものになると考える。