

第 17 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 17 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 25 年 1 月に QCWS 開催及び参加申込みの案内を、学会誌および学会ホームページ（以下、学会 HP）に掲載し、平成 25 年 2 月までに 72 施設（DNA-QC:67 施設、抗体 QC:50 施設）からの参加申し込みがあった（表 1）。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。

DNA-QC および抗体 QC に用いる試料の選択は、第 21 回大会会期中に開催した QCWS 部会で協議した基本的な方針に従った。

また、各施設から提出された結果の解析は、検査法別と臨床部門別に解析を行うこととし、臨床部門（以下 4 部門、輸血、臓器移植、造血幹細胞移植、その他（研究等））については、参加申込書の記載に従った。

4 月 3 日に試料を発送し、4 月 8 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 11 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。5～6 月中旬に生データの取りまとめ、6 月 25 日に各解析担当者にデータが配布され、解析が行われた。各検査法別の解析結果を 7 月 20 日に締め切り、8 月上旬までの間、各検査法解析担当者間で解析結果の取り纏めについてメールでのディス

カッションを行い、解析結果の公表内容を統一化した。平成 25 年 8 月中旬までに、最終報告データを作成し、解析結果をホームページで公開し、参加者が必要に応じてダウンロード出来るようにした。また、解析結果は QCWS 集会での報告及び本学会誌（MHC）への掲載を行った。

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 抗原型に正確に読替えること、⑤日本人集団における ambiguity となるアレルの解説の 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 アレルであること」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

[#] 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⁾、中島文明¹⁾、成瀬妙子²⁾、一戸辰夫³⁾、石塚 敏⁴⁾、太田正穂⁵⁾、吉川枝里⁶⁾、木村彰方²⁾、高 陽淑⁷⁾、小林孝彰⁸⁾、橋口裕樹⁹⁾、宮崎 孔¹⁰⁾、森島泰雄¹¹⁾、安波道郎¹²⁾、山本 賢¹³⁾、湯沢賢治¹⁴⁾

¹⁾ 日本赤十字社中央血液研究所、²⁾ 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野、³⁾ 東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室、⁴⁾ 広島大学原爆放射線医学研究所血液・腫瘍内科研究分野、⁵⁾ 信州大学医学部、⁶⁾ 東海大学医学部生命科学、⁷⁾ 日本赤十字社近畿ブロック血液センター、⁸⁾ 名古屋大学移植免疫学寄附講座、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⁾ 国立病院機構大阪医療センター臨床検査部、¹⁴⁾ 国立病院機構水戸医療センター臨床研究部移植医療研究室

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. 解析方法

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

②Lab Screen、③WAK 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

九州ブロック血液センター 黒田ゆかり

イノリパ (SSO法) について

東京女子医科大学中央検査部 安尾美年子

SSP法について

県立広島病院臨床研究検査科 藤井 明美

SBT法について

東海大学医学部 重成 敦子

表1 第17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	37	公立大学法人 横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部
2	関西医科大学附属枚方病院	輸血・細胞療法部	38	大分県立病院	輸血部
3	株式会社ビー・エム・エル	第三検査部 ゲノム検査課	39	筑波大学	消化器外科研究室
4	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	40	東京女子医科大学	中央検査部 移植関連検査室
5	仙台社会保険病院	検査部	41	金沢医科大学病院	北陸腎移植HLA検査センター
6	日本赤十字社 中央血液研究所	研究開発部	42	広島大学病院	輸血部
7	富山大学附属病院	輸血・細胞治療部	43	国立病院機構 岡山医療センター	臨床検査科
8	北海道大学病院	検査・輸血部	44	岐阜大学病院	検査部
9	熊本大学医学部附属病院	中央検査部	45	虎の門病院	輸血部
10	獨協医科大学病院	臨床検査センター 遺伝子・HLA検査室	46	九州ブロック血液センター	検査二課
11	中四国ブロック血液センター	検査一課	47	伊勢赤十字病院	臨床検査部 輸血検査室
12	NPO法人腎泌尿器疾患研究所		48	京都府立医科大学附属病院	移植・一般外科(腎移植センター)
13	近畿ブロック血液センター	検査部 検査三課	49	徳島大学病院	輸血部
14	松江赤十字病院	検査部 輸血管理室	50	札幌北楡病院	臨床検査科
15	香川大学医学部附属病院	輸血部	51	京都大学医学部附属病院	iPS細胞臨床開発部
16	がん・感染症センター 都立駒込病院	輸血・細胞治療科	52	社会保険中京病院	検査部
17	東北ブロック血液センター	品質部 検査一課	53	山形県立 中央病院	輸血部
18	東海大学医学部附属病院	診療技術部 移植免疫	54	三菱化学メディエンス株式会社	遺伝子分析研究部 遺伝分析グループ
19	香川県立中央病院	中央検査部	55	高知医療センター	SRL検査室
20	鷹揚郷研究所 弘前病院	HLA検査室	56	県立広島病院	臨床研究検査科
21	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部	57	東海大学	医学部基礎医学系 分子生命科学
22	国立循環器病研究センター	臨床検査部 輸血管理室	58	旭川医科大学病院	臨床検査・輸血部
23	東海北陸ブロック血液センター	検査三課	59	株式会社 医学生物学研究所	品質保証部
24	株式会社 ベリタス	技術推進部	60	北海道ブロック血液センター	検査一課
25	市立札幌病院	HLA検査室	61	国立病院機構千葉東病院	臨床検査科
26	福岡赤十字病院	検査部 HLA検査室	62	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
27	岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部 免疫血清検査室	63	湘南鎌倉総合病院	検査部
28	医療法人 立川が 医療センター 立川総合病院	HLA検査室	64	関東甲信越ブロック血液センター	検査部 検査三課
29	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部	65	公益財団法人 HLA 研究所	
30	株式会社 保健科学研究所	精度保証室	66	静岡県立病院機構 静岡県立総合病院	検査部 輸血・細胞治療科
31	帝京大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター	67	兵庫県立西宮病院	腎移植センター
32	湧永製薬株式会社	試薬・診断薬事業部	68	関東甲信越ブロック血液センター 埼玉製造所	品質部 検査三課
33	株式会社 リプロセル	技術部	69	株式会社エスアールエル	遺伝子染色体解析センター 遺伝子検査課
34	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部	70	名古屋第二赤十字病院	組織適合検査室
35	独立行政法人 国立病院機構 米子医療センター	臨床検査科	71	愛媛県立衛生環境研究所	疫学情報科
36	信州大学医学部	法医学教室	72	沖縄県立中部病院	検査科

HLA タイピング結果の表記法

福岡赤十字病院検査部 橋口 裕樹

2) 抗体検査結果解析

FlowPRA 法の検査状況の解析

東京女子医科大学中央検査部 石塚 敏

Lab Screen による抗体検査

一般財団法人 HLA 研究所 二神 貴臣

WAK Flow および ICFA 法について

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

日本赤十字社中央血液研究所 中島 文明

3) 部門別解析及び結果評価

DNA タイピング

近畿ブロック血液センター 石井 博之
抗体検査

近畿ブロック血液センター 高 陽淑
全血クロスマッチについて (追加発言)

福岡赤十字病院 橋口 裕樹

5. QCWS サンプルの総合結果

配布した DNA 及び抗体サンプルについて、本ワークショップで解析された総合結果を示す。DNA サンプルについては、日本赤十字社中央血液研究所で精査した結果を加え、総合的にリアサインした。各ローカスは、1本鎖 DNA に分離してから塩基配列を確定し、可能な限り Ambiguity を回避した。参照ライブラリーは、HLA-A, B, C, DR が IMGT/HLA 3.12 (2013-04), HLA-DQB1, DPB1 が 3.11 (2013-01) である。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)。抗体サンプルは、日本人 HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の抗原に対する反応と 0.1% 未満の抗原に対する反応に分けて示した。スコア「8」は 3 分の 2 以上の参加施設が陽性判定した抗原、スコア「1」は 3 分の 2 以上の参加施設が陰性判定した抗原、スコア「4」はどちらも 3 分の 2 に達しない抗原で表している (表 3)。これらの結果が各施設の精度管理、技術向上に役立つことを期待する。

表 2 第17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	
H2501	A*33:03:01 A33	A*24:02:01:01 A24	B*44:03:01 B44	B*51:02:01 B5102	C*14:03 Cw14 ※	C*15:02:01 Cw15 ※
H2502	A*24:02:01:01 A24	A*02:03:01 A203	B*52:01:01:01 B52	B*56:01:01 B56	C*12:02:02 Cw12 ※	C*01:02:01 Cw1
H2503	A*03:01:01 A3	A*24:02:01:01 A24	B*44:02:01:01 B44	B*07:02:01 B7	C*05:01:01:01 Cw5	C*07:02:01:01 Cw7
H2504	A*31:01:02 A31	A*26:02 A26	B*39:02:02 B3902	B*15:01:01:01 B62	C*07:02:01:01 Cw7	C*03:03:01 Cw9

HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
H2501	DRB1*13:02:01 DRB3*03:01:01 DR13 DR52	DRB1*09:01:02 DRB4*01:03:01 DR9 DR53	DQA1*01:02/08/09 DQB1*06:04:01 DQ6	DQA1*03:01/02/03 DQB1*03:03:02 DQ9	DPA1*01:03 DPB1*02:01:02 DPw2	- DPB1*04:01:01 DPw4
H2502	DRB1*15:02:01 DRB5*01:02 DR15 DR51	DRB1*13:12:01 DRB3*02:02:01 DR13 DR53	DQA1*01:03 DQB1*06:01:01 DQ6	DQA1*05:03/07 DQB1*03:01:01 DQ7	DPA1*02:02 DPB1*05:01 DPw5	DPA1*02:01 DPB1*09:01:01 DPw9 ※
H2503	DRB1*04:03:01 DRB4*01:03:01 DR4 DR53	DRB1*01:01:01 - DR1 -	DQA1*03:01/02/03 DQB1*03:02:01 DQ8	DQA1*01:01/04/05 DQB1*05:01:01 DQ5	DPA1*01:03 DPB1*04:02:01 DPw4	- - -
H2504	DRB1*14:54:01 DRB3*02:02:01 DR14 DR52	DRB1*14:06:01 DRB3*02:02:01 DR14 DR52	DQA1*01:01/04/05 DQB1*05:03:01 DQ5	DQA1*05:03/07 DQB1*03:01:01 DQ7	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17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 Luminex 法—

黒田ゆかり¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 九州ブロック血液センター

1. 概要

Luminex 法の参加施設は、今年 DNA-QC に参加した 66 施設中 38 施設 (57.6%) であり、昨年から 7 施設増えていた。使用キットは、OneLambda 社製 LABType が 12 施設、LABType HD が 10 施設、湧永製薬株式会社製 WAKFlow が 20 施設、医学生物学研究所製ジェノサーチが 5 施設であった。LABType 使用の 12 施設中 6 施設は、同試薬を HLA-DP または DQ 座のタイピングにのみ使用しており、HLA-A, B, C, DR 座のタイピングには、LABType HD や WAKFlow を使用していた。

タイピング実施ローカスは、全施設が HLA-A, B のタイピングを実施しており、その他 HLA-C (32 施設, 84.2%), HLA-DRB1 (37 施設, 97.4%), HLA-DRB3/4/5 (2 施設, 5.3%), HLA-DQA1 (9 施設, 23.7%), HLA-DQB1 (18 施設, 47.4%), HLA-DPA1 (5 施設, 13.2%), HLA-DPB1 (11 施設, 28.9%) の報告があった。

2. 解析方法

解析は、HLA-A, B, C, DRB1 座の結果を対象とし、以下の 3 項目について行った。

- 1) 結果の表記
- 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 (%CV)
 - 各プローブの Pmin/Nmax 値 (P/N 値) の比較
 - 各施設のカットオフ値の変更状況
- 3) アサインミスとその原因

詳細なデータについては、学会ホームページに掲載の「第17回 QC ワークショップ報告集」を参照いただきたい。

3. 結果と考察

1) 表記については、年々増加するアリルにより複雑化してきたが、ambiguity として可能性のある全アリルを対象とし、表記法の原則に基づいた記入が必要である。

2) 反応データの確認には、各施設から提出していただいた CSV ファイルを用いた。陽性コントロールビーズは、4 検体 (H2501 ~ H2504) において同等の蛍光値が期待され、ばらつきが少ないことが基本であるが、HLA-C Exon3 において %CV が 54.6% と大きくばらついている施設があった。それ以外にも %CV が 40% 以上の施設が 4 施設あり、ばらつきが大きい施設は他施設と比較すると蛍光値が低い傾向にあった。

Pmin/Nmax 値については、大きな施設間差はなかったが、小さな数値を示している場合には、反応のメリハリが少なくなり、カットオフ値の適切な設定が困難になることが考えられる。

また、カットオフ値については、変更が必要であった施設数が、全く変更しなかった施設数を上回った。カットオフ値は、変更プローブ数が多くなるほどアサインミスに繋がる可能性が高くなるため、安定した技術が求められる。今回、多数の偽陰性 (False Negative) が見られ判定が困難で明らかに再検査が必要であったと思われた施設や、陽性時の反応に近い蛍光値を示した偽陽性 (False Positive) が見られた施設などもあり、それらの施設では技術的な改善のみならず解析時の判断基準の見直しも必要であると思われた。

QCWS では、匿名化した各施設のデータが全参加施設に CD-ROM で配布されており、自施設のデータを他施設と比較することが可能であることから、是非配布されたデータを活用し改善に繋げていただきたい。

3) アサインミスとして、記入や転記によるミスと明らかな誤判定とがあった。記入ミスの中には、ハプロタイプを確認することにより、ミスの回避が可能であったと思われる事例があり、HLAに関する知識を持ち総合的に判定することが必要である。

誤判定は、2施設で3種類の検体に認められ、いずれもカットオフ値変更の判断ミスであった。技術的に不安定なことから、偽陽性 (False Positive) や偽陰性 (False Negative) の見極めが困難であった。また、複数のプローブに対する偽陽性 (False Positive) が見られているにも関わらず、一部のカットオフ値のみを変更し判定が行われており、各プローブの反応性を十分に確認されていないことが示唆された。

他の施設では、頻度の高いタイプに判定を合わせて、明らかな陰性反応を陽性に変更し判定しており、誤判定に繋がっていた。

4. まとめ

臨床において、タイピング結果は移植成績に大きな影響を与える。正しいタイピングには、「安定した技術」、「解析における的確な判断」および「HLAに関する知識」が必要である。タイピングミスがあった施設のみならず、各施設において再度自施設のデータを確認し改善すべき点があれば対応していただきたい。また、不明な点などはQCWS事務局や解析担当者へご確認いただきたい。

第 17 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⁾ 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室

1. はじめに

INNO-LiPA は Dynal RELI に替わる SSO 法のタイピングキットであるが、今年はまだこの方法による参加施設数はそれほど増えていない。理由として考えられるのは、手技が少々煩雑で所要時間も長いことから、まだこのタイピング法の手技や判定に慣れないことなどがある。

昨年、INNO-LiPA の解析ソフトによる判定について、日本人に多いアレルを優先しなければ、抗原型も決定できない可能性が高くなると報告したが、この問題は他のキットでも同様である。

QCWS ではこのような事実を理解したうえで、日常検査において日本人に多く見られるアレルを優先したタイピング結果を報告していることを再確認するためにも、来年度 (第 18 回) からは方法別の結果判定では、日本人に多くみられるアレルを優先するのではなく、学会の表記法に従い、判定されたすべてのアレルを対象とすることとした。

2. 解析結果

参加 7 施設のうち 1 施設は SSP の補助としての使用であり、HLA-C および DQ ローカスのデータ提出施設は 1 施設だけであった。また、HLA-DR ローカスの DRB3/4/5 が判定できる decoder キットを使用した施設も 1 施設だけであった。

1) 結果判定

クラス I については、記載ミス以外には特に問題はなかったが、同一キットの使用でも第 2 区域の ambiguity に違いが見られた。また、H2504 では ambiguity の無いアレルがあったが、判定ソフトで日本人に多くみられるアレルの組み合わせを選んだ場合、6 桁の ambiguity の

みであることから、4 桁で ambiguity 無しの場合も正解とした。

クラス II については、decoder キットを使用した場合は、タイピング用プローブが追加されることとなるため、結果判定の ambiguity は異なってくる。誤判定は 1 件、その他は ambiguity が無い・記載ミス・表記ミスが各 1 件見られた。誤判定の原因は、弱い false positive 反応を陽性と判定したためである。

2) Ambiguity の違いについて

同一キットであるにも関わらず ambiguity の表記方法が異なっていた。その要因として、判定ソフトで反応パターンと一致するアレル候補の選択範囲が異なっていたためと推察される。一方は、日本人アレルが含まれる組み合わせでの ambiguity を表記し、他方は、全アレル候補での ambiguity を表記だった。今回までは表記の基準を明確にしていなかったため両方が混在しているが、次回からは出来る限り全アレルから ambiguity を選んでいただきたい。

3) 反応状態について

スコア 4 のバンドが多い施設があった。PCR の増幅が不良と考えられるため、原因を調べる必要がある。False negative は、判定結果に影響がなく、一部の施設 (25D26) に特異的に見られたことから入力ミスの可能性もある。False positive については、1 ヶ所を除いては判定には影響がなく、多くが弱いスコアであるため、発色時間の長さが原因と考えられた。

3. おわりに

今回は全体に大きな問題は無く判定出来たと考えている。

低・中解像度の HLA タイピング試薬を用いた検査を

実施している施設は少なくない。また、公認されるアレルが急増している現状では、日常での HLA タイピングは、日本人に多く見られるアレルの中から、可能性の高いアレルを推察し、HLA のタイピング結果としているのが実情である。

次回から方法別では日本人に多いアレルは考慮せずに、判定ソフトで得られる候補となるアレル全てからの Ambiguity の表記が必要となることは、現状のタイピングレベルを知るためには有用と考える。

第 17 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

1) 参加状況

SSP 法での参加施設は 31 施設（全参加施設の約 46%）であり、昨年と比べると 4 施設増えていた。このうち SSP 法のみでの参加施設は 22 施設（昨年度比 4 施設増）、その他のタイピング法を併用していた施設は 9 施設であった。

2) 参加部門

SSP 法での参加 31 施設中、24 施設は臓器移植部門または臓器移植部門と輸血関連、造血幹細胞移植部門との複数参加であった。また、臓器移植部門のみでの参加施設では、SSP 法のみでの参加が多い傾向にあった。

3) 使用試薬

今回使用されていた試薬は、低解像度（low resolution）試薬 5 種類、中解像度（medium resolution）試薬 2 種類であった。なお、medium resolution 試薬使用施設はすべて、他の検査方法との併用参加であった。また、Micro SSP（OneLambda 社）の使用施設が多く、中でも日本人向けに開発販売された Micro SSP JPN の使用施設は 22 施設（SSP 法参加の 71%）と年々増加傾向にある。

2. 解析結果および考察

解析は QCWS 部会で把握している Consensus Allele 情報を基に、結果の評価項目である、1. 判定が正しいこと、2. SSP 法の結果が総合判定と齟齬がないこと、3. 相対的に反応データに、偽陽性（以下、false positive という。）または偽陰性（以下、false negative という。）がないことでチェックを行った。

その他、表記の不備等により結果の解析が困難であった報告を「解析困難」として示した。ただし、これら「解析困難」と示したものは評価においては対象外である。

結果の詳細は、学会ホームページに掲載しているのをご参照していただきたい。

1) 判定ミス（miss assign）

判定ミスの主な要因は、①反応の不備（false positive）、②ambiguity が正しく判定されていないであった。①の反応不備による判定ミスは、同施設で複数検体報告されており検査方法の見直しや再確認等原因の究明が必要と思われる。②の ambiguity が正しく判定されていない場合の判定ミスとなった原因の多くは、解析ソフトの未使用またはバージョン違いと考えられる。解析ソフトは必ず使用すること、及びバージョンアップ等により最新のデータを採用する必要がある。

2) 相対的反應データの不備

反応データに不備が認められた 8 施設では false positive が多くみられ、そのうち 6 施設で判定ミスが認められた。他の 2 施設では、判定は正しく行われていたが記載ミスが一部で認められた。

3. まとめ

本年度は昨年度より参加施設が増加し、新規の参加施設が増えたためか、判定間違い及び反応データの不備が散見された。特に false positive により判定間違いをした施設は、早急に検査方法および判定方法の再確認をおこなう必要がある。また、反応データのスコア化に不慣れた施設もあり、今後スコア化のマニュアルを提示することが必要であると思われた。

SSP 法によるタイピング結果の判定が困難を来す要因として、SSP 法で使用する試薬のほとんどが、低解像度試薬（第 1 区域までの判定試薬）であることが挙げられている。結果報告や解析を円滑に行うために、今後も随時検討が必要と思われる。

第 17 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 1)

今年度の参加施設数は 7 施設で、SBT 法を用いた 6 施設と、今年度初めて次世代シーケンサーによる SS-SBT 法を用いた 2 施設からの参加があった。

SBT 法で使用されたキットは、AlleleSEQR HLA typing kits (CELERA) が 6 施設で、その中の 1 施設で SeCore Sequencing Kits (Invitrogen) と SBT RESOLVER (CONEXIO) を併用していた。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。

SS-SBT 法で使用された次世代シーケンサーと試薬は 2 施設で異なっており、1 施設では GS Junior と GS Junior Titanium sequencing Kit (Roche)、他 1 施設では Ion PGM と Ion PGM 200 Sequencing Kit (Life Technologies) を使用していた。データ解析は、Omixon Target, Automated NGS data processing system (Suzuki 法)、Assign MPS を使用していた。

2. 使用キットについて

今回の QCWS で使用されていたタイピングキットは 3 種類 (AlleleSEQR HLA typing kits (CELERA), SeCore Sequencing Kits (Invitrogen), SBT RESOLVER (CONEXIO)) あり、何れも HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 座のタイピングが可能であるが (図 2)、タイピングとして解析される HLA 遺伝子領域は異なっている。

全施設で使用されていた AlleleSEQR と比べ、SeCore DPB1 Locus Sequencing Kits はエクソン 2, 3, 4 領域のシーケンシングプライマーが含まれており、より長い領域の解析が可能である。

また、SBT RESOLVER kits は、他の試薬よりさらに長い領域が解析可能であり、特に HLA-C は、エクソン

1～7 領域までの解析が可能である。

さらに、AlleleSEQR typing kits の補足試薬 (別購入) を使用しアンビギュイ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、アンビギュイティーを減らした施設もあった。

3. 結果及び考察

1) SBT 法での解析結果と考察

今回、全施設で 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/HLA 3.11, 2013-01-17) を使用し、Assign3.6+ で解析した結果を正解回答とした (図 3)。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 4)。

① アリルの絞り込み (図 5)

HLA-DRB1 のタイピングキットには 3 種類のシーケンシングプライマー (エクソン 2 Forward, エクソン 2 Reverse, Codon86) が添付されている。この Codon86 プライマーは、HLA-DRB1 のコドン 86 番目の GTG モチーフのシーケンシングプライマーである。

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リ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、H2503 が Codon86 の配列決定により、HLA-DRB1*01:01/50, DRB1*04:03:01 とさらに絞り込みが可能であった。

② 表記ミス

SBT 法は、high resolution のタイピング法なので、第 2 区域までの表記が必要である。また第 3 区域、第 4 区

域までのアレル特定できた場合は、特定できた領域までのアレルを表記する(図6)。H2503のHLA-Cでは、第1区域アンビグニティーのアレルが機械的にバラバラに並ぶ場合、アレルをまとめて表記する(図7)。これは、「HLA タイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則」のII.1 (2)に相当するため、C*05:01/08:02/+, C*07:02/17/37/+と表記する。

また、H2503とH2504のHLA-DPB1のタイピングで、第1区域に異なるアレルが存在して他方のアレルも同じアレル場合は、片方のアレルに集約が出来るので、ホモ接合体のアンビグニティーになるため、H2503はHLA-DPB1*04:02/105:01,-となり、H2504はHLA-DPB1*05:01/135:01,-と表記する(図8)。また、SeCore DPB1 Locus Sequencing Kitsを使用し、アレルの絞り込めた施設もあった。

H2504のHLA-DRB1のタイピングでは、DR14とDR14のアンビグニティーで、Codon86 (GTG) プライマーを使用しても絞り込むことは出来なかった(図9)。このように、第1区域に同じアレルが存在する場合の表記は、DR14に集約すると、ホモ接合体のアンビグニティーを意味することになるので、アレルの数字が小さい順に記載する。この場合、HLA-DRB1*14:01とDRB1*14:06の移植における適合性判定の便宜性を考慮し、アレルを並び替えて表記することが理想的と思われる。

2) SS-SBT法での解析結果と考察

今年度のQCWSで初めてSS-SBT法による解析結果の報告が2施設からあった。SS-SBT法は、遺伝子の全領域(5'UTRから3'UTRまで)を増幅し解析する(DRB3/4/5は、エクソン2からの領域を解析する)ことが出来る。GS Junior (Roche)の次世代シーケンサーを使用し、QCWSを行った時点での最新のリファレンス(IMGT/HLA 3.11, 2013-01-17)にもとづき、解析ソフト(Omixon Target, Automated NGS data processing system (Suzuki法), Assign MPS)を使用した結果、アンビグニティーがなく、一部のサンプルでアレル表記が第4区域まで絞り込むことが可能であった(図10)。本レポートでは、2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11)。

①表記ミス(図12)

SS-SBT法は、high resolutionのタイピング法なので、

少なくとも第2区域までの表記が必要である。またタイピングの結果から第3区域、第4区域までのアレル特定できた場合は、特定できた領域までのアレルを表記する。

ヘテロ接合体の場合は、数字の小さい順に表記する。また、片方のアレルに集約が出来るホモ接合体のアンビグニティーで、第1区域で判別が出来ないアレルが複数存在する場合は、第2区域まで記載し「/(スラッシュ)」でつなぐ表記する。

②SS-SBT法での問題点

今年度QCWSのSS-SBT法で、1施設からH2504のHLA-Bに1塩基の同義置換が認められたと報告があった(図13)。このような新規アレルの表記は、“undefined”とし、コメントでその違いを記載することが必要である。

また、H2504のHLA-DRB1のタイピングでDRB1*14:54のみしか検出できない解析結果であった(図13)。しかし、SBT法ではDRB1*14:01グループと、DRB1*14:06グループのアンビグニティーと結果が得られている。これにより、SS-SBT法のHLA-DRB1ではDRB1*14:06グループのPCR増幅が認められなかったと考えられる。その後、SS-SBT法のDRB1のプライマー改良が行われ、DRB1*14:06グループのPCR増幅が可能になったことが確認されている。

さらに、SS-SBT法を行った2施設で、H2503のHLA-CでHLAタイピング結果が異なる判定をしていた(図14)。このH2503はSBT法の結果より、HLA-BはB*07:02:01, HLA-B*44:02:01:01であり、HLA-CはC*05:01:01:02, C*07*02:01:03である。

すなわち、HLA-C*05:03は判定ミスである。今回のSS-SBT法で使用するプライマーや解析方法は同じなため、異なる原因として考えられるのは、この2施設で使用していた次世代シーケンサーの違いと考えられた。

次世代シーケンサーと試薬組み合わせは、1施設でGS Junior (Roche)とGS Junior Titanium sequencing kitを、他1施設ではIon PGM (Lifetechnologies)とIon PGM 200 bp sequencing kitを使用していた。これらの次世代シーケンサーで得られる配列の長さは、GS Juniorの平均は約500 bpで、Ion PGM 200 bp Kitの平均は約150 bpであった。結果が異なったさらなる原因としては、H2503のHLA-BとHLA-Cのアレルの組み合わせが関係していた(図15)。

今回のSS-SBTの解析では、H2503のHLA遺伝子の

PCR産物を全て混ぜて1つのサンプルとして解析している。それぞれの塩基配列を調べてみると、B*44:02:01:01とC*05:03でエクソン4領域の始めから154 bpが完全に一致していた。GS Juniorからの塩基配列が約500 bpと長いのでHLA-C*05:03とミス判定されないが、Ion PGMから得られた塩基配列の平均が150 bpと短いためにC*05:03とミス判定になったと思われる。

今後、シーケンサーとキットの改良により長い塩基配列が読めるようになると、この問題は解決すると考えられる。

4. まとめ

今年度のSBT法の不正解の理由は、表記ミスであった。SBT法を行う際には、きれいなシーケ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イティーの表記に注意する必要がある。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。しかし、毎年アレルの登録が増加している。これにより、アンビグイティーの表記だけでは分かりにくい部分も出てきているため、コメントの記載の必要性もあると思われる。また、必要に応じて補足試薬などを使用し、アンビグイティーを減らすことも考慮しなければならない。

今年度初めてSS-SBT法による参加があった。このSS-SBT法により、新規アレルが見つかる可能性があり、アンビグイティーをなくす方法としては最適と考えられる。しかしながら、問題点も多く見付き、今後、次世代シーケンサーの改良によりこれらの点を解決し、さらに長い塩基配列が得られることにより、得られた情報を正しく判定することが必要と考えられる。

このように、QCワークショップに積極的に参加することで、施設の精度を保持または、確認することができると思われる。

第17回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA HLA タイピング表記法—

橋口 裕樹¹⁾

¹⁾福岡赤十字病院

1. 概要

第17回 QCWS 参加施設は、66 施設あり、結果の表記は例年通り 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。ローカス別での参加数は、HLA-A, B 座、全 66 施設 (100%)、DRB1 は 65 施設 (98.5%)、C は 54 施設 (81.8%) 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。

2. 表記法の改訂と注意点

「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)」の改訂部分の抜粋と改訂に伴う表記の注意点を以下に示す。

2-1. 改訂箇所 (1)

「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)」の「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、以下の改訂が行われた。

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「/ (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)」を付記することとされた。

この改訂に伴う注意点としては、使用する試薬がどこまでの分解能 (Resolution) があるのかを確認し、表記する内容を判断する必要がある。例えば、低解像度 (Low Resolution) の試薬により、日本人で高頻度という理由等で、安易に 4 桁レベルの高解像度 (High Resolution) での表記は混乱を招く原因となる。試薬の分解能にあわせた表記が必要である。

2-2. 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。

今回の H2501 を使った表記例は、以下のとおりになる。

- アリル表記を A*24:02/03/04/+ とした場合は、HLA 型は A24/2403 と表記する。
- アリル表記を A*24:02/11/20/+ とした場合は、HLA 型は A24 と表記する。
- アリル表記を A*24:02 とした場合は、HLA 型は A24 と表記する。

HLA アリル型から HLA 型を表記する場合、普段は HLA 型を 2 桁のみで省略して記載している施設もあるが、学会の表記の原則では、複数の HLA 型の可能性がある場合、最も数字の小さい HLA 型から順番に記すことになっているので注意が必要である。表 1 に示すアリル型を HLA 型に表記する時は特に注意が必要である。

2-3. 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、以下の内容が追加された。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

表1 HLA アリルから HLA 型への読替え

HLA アリル型	HLA 型
A*02:03	A203
A*02:10	A210
A*24:03	A2403
A*24:10	A2403
A*24:23	A2403
A*24:33	A2403
B*39:01	B3901
B*39:02	B3902
B*51:02	B5102
B*51:03	B5103
DRB1*01:03	DR103
DRB1*14:03	DR1403
DRB1*14:04	DR1404

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。

この改訂に伴い、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、空白でなく第1区域を用いて HLA 型を表記する必要がある。今回のサンプルを使った表記例は、以下のとおりになる。

- H2501 アリル表記を C*14:02 とした場合は、HLA 型は Cw14 と表記する。
- H2502 アリル表記を C*12:02 とした場合は、HLA 型は Cw12 と表記する。

表2 誤りのアリル表記

誤表記	誤表記例
“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*2402
“:” が全角 (-5)	A*24 : 02/03/04/+
“*” の表記なし (-5)	A24:02/03/04/+
“*” が全角 (-5)	A*24:02/03/04/+
ローカス名なし (-5)	*24:02/03/04/+

表3 誤りの HLA 表記

誤表記	誤表記例
小さい順に表記されていない (-10)	A203/2
小さい順に表記されていない、/の後ろには HLA 型は表記しない (-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
“0” をつけて表記している (-10)	Cw07
Cw の “W” が大文字 (-10)	CW1
Cw の “w” を表記していない (-10)	C7

3. 減点対象例

表記における減点項目と減点数は表2および表3のとおりである。

4. 考察

今回も例年同様に、HLA アリルから HLA 型への読替えでの誤りが目立った結果となった。再度、学会ホームページ上にある表記の原則を熟読されて、自施設での表記の問題点を明確にし、次年度の QCWS に備えて頂きたい。

第 17 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

第 17 回 HLA-QCWS で FlowPRA 法による HLA 抗体検査を実施した施設は、22 施設であった。FlowPRA Screening test の実施施設数は、HLA Class I 抗体が 22 施設、HLA Class II 抗体が 21 施設であった。内訳は、輸血関連が 8、臓器関連が 17、造血関連が 5 施設（重複施設を含む）であった。FlowPRA Single Antigen test は、HLA Class I 抗体が 4 施設で、HLA Class II 抗体が 3 施設（すべて臓器関連施設）で実施されていた。

また、分析機器として Becton, Dickinson and Company10 施設、Beckman Coulter12 施設であった。

2. 解析方法

各施設から提出して頂いた FCS ファイルを解析ソフト（FlowJo: Tree Star, Inc. USA）を用いて、試薬メーカーがある程度提示している解析基準に沿って統一した条件設定による再解析を行った。そして、各施設の提出用ファイルに添付されているデーターとの比較解析を行った。

FlowPRASingle Antigen test は、各施設の提出用ファイルデーターから判定保留を除外し、参加施設の判定スコアから陽性率・陰性率、一致率を求めた。

FlowPRA 法の解析について詳細な集計データー等は、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たい。

3. FlowPRA Screening test 解析結果

今回配布された 4 種類の QCWS の試料は、HLA Class I 抗体すべて陽性・HLA Class II 抗体 SH2501・SH2502・SH2504 陽性、SH2503 陰性を示した Sample であった。

各施設から報告して頂いた判定スコアによる解析で

は、HLA Class I 抗体一致率 100%、HLA Class II 抗体も一致率 100% であった。

各施設から報告して頂いた陽性率 % による解析では、HLA Class I・II 抗体の最大・最小値において施設間差を認める結果であった。しかし、再解析した結果と各施設から報告して頂いた陽性率 % には、ほとんどの施設で相違は認められなかった。

今回、各施設から報告して頂いたデーターのうち再確認が必要であると思われる事例は、Negative control ヒストグラム of Anti-Human IgG-FITC である横軸との接点を count 軸側（左側）にカットオフ位置として設定されている施設、分析機器の設定不良により Negative control のヒストグラムデーターが一部欠損している施設、測定法には特に問題はなさそうであるが再解析の結果と比較して Anti-Human IgG-FITC の反応性が弱い施設、そして SH2502 の Sample にのみ Control Beads の右方シフトである非特異的の反応を認めた 6 施設があった。Control Beads の右方シフトについては、施設によって Adsorb-Out など非特異的の反応処理済であるとコメント欄に記載があり、今後、有効な方法が必要であると思われる。

再度、分析機器の初期設定や陰性・陽性領域のマーカー設定・Sample の非特異的の反応処理および Anti-Human IgG-FITC の力価等について再確認して頂きたい。

4. FlowPRASingle Antigen test 解析結果

各施設から提出して頂いたドットプロットデーターと再解析データーを比較すると施設によって分析機器の設定基準に相違があることが認められた。その要因として考えられるのは、使用されている Negative Control Serum の違いではないかと思われる。

4 施設中 2 施設がメーカー純正の Negative Control

Serum, 1 施設が Donor Serum, 1 施設が Negative Control を使用せず, 以前に設定されたポジションで判定しているようであった。そのため, 施設によっては, 分析機器の設定不良によりデータの反応性に相違を認めている可能性が考えられる。また, 各施設によって陰性・陽性領域のマーカー設定基準に相違があることも若干結果の乖離が生じている原因であると思われる。

SH2502 の QC Sample は, FlowPRA Screening test と同様に Control Beads の右方シフトである非特異的反応が認められる施設があった。しかし, 施設によっては Adsorb-Out など非特異的反応処理済であるとコメント欄に記載があり, FlowPRA Screening test と同様に今後, 有効な方法が必要であると思われる。

5. まとめ

本年度の解析結果から昨年度と同様に FlowPRA Screening test では, 陽性率%において最大・最小値に施設間差を認める結果であった。そのため, 来年度に向けた施設間差を小さくする共通化したプロトコールなどの取り組みが必要であると考えられる。

FlowPRA Single Antigen test は, 分析機器の設定基準を共通化するにはメーカー純正の Negative Control Serum を使用して分析機器調整することが望ましいと考えられる。そして, 来年度に向けて陰性・陽性領域のマーカー設定基準の検討が必要であると考えられる。

第 17 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 LABScreen—

二神 貴臣¹⁾

¹⁾ 公益財団法人 HLA 研究所

1. はじめに

LABScreen による抗体検査を実施した施設数は、30 施設（輸血：19，臓器：17，造血：18，その他：1）であった。LABScreen Mixed によるスクリーニングのみを実施した施設は 1 施設であった。LABScreen Mixed，Multi・PRA 法のいずれかまたは複数の試薬を用いたスクリーニングの後に LabScreen Single Antigen（以下，SA）で同定を実施した施設は 10 施設，SA で同定のみを行った施設は 19 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 5 施設，Multi を用いた施設も 1 施設あった。判定ソフトは 1 施設（自家製）を除いたすべての施設で HLA Fusion が使用された。

2. 結果の解析および考察

1) 判定の不一致

抗体有無の判定について Class I は全施設が陽性と判定し一致していた。Class II では SH2403 に乖離が見られた。SH2403 Class II は陰性 23 施設，陽性 3 施設であった。Cutoff 付近の抗原であることと，蛍光値（MFI）に施設間差があり，その結果乖離したものが多いと考えられる。

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。MFI1,000 程度を cutoff としている施設が多く見られた。また，ある施設では 2,000 を超える値を陰性と判定し，別の施設では 600 程度を陽性と判定しているケースもあり，施設によって判定基準が異なっていた。

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 MFI 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，差が大きなところでは 3,000 程度の差が見られ，例年の 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。

4) その他の判定不一致

検査時にビーズの入れ忘れと思われる例が 1 例とコンタミが疑われる例が 1 例あった。ビーズの入れ忘れは直前の検体の残ビーズだけを読み込んでしまい，誤判定につながる。判定時には MFI だけでなく，ビーズカウントも含めて全体を見ることが求められる。また，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る。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。乖離の原因は施設間 / 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ピ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 17 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 WAK&ICFA 法—

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、WAKFlowMR）での参加施設数は、クラス I で 13 施設と前年より 3 施設増加しており、微増傾向であった。クラス II は 8 施設と前年より 2 施設増加していたが、ほぼ横ばいであった（Fig. 1）。クラス I の試薬ロットは、3 施設で N0A を、それ以外の施設は M0B を使用していた。血清処理を行っている施設は、7 施設であり、未処理は 6 施設であった。一方、クラス II の試薬ロットは、1 施設で L0A を、7 施設で M0A を使用していた。また、2 施設においてのみ血清処理が行われていた（Table 1）。

解析結果の詳細は、学会ホームページ「第 17 回 QC ワークショップ報告集」の HLA 抗体「WAKFlow による解析結果」を参照されたい。

2. WAKFlow-MR クラス I

バックグラウンドビーズ (BB) ポジティブビーズ (PB) の蛍光強度の施設間差について、Fig. 2 の赤丸で示した施設（施設番号 10）の被検血清全て、青丸で示した施設（施設番号 20）の SH2503 と SH2504 血清の 2 血清において、他施設と比較して明らかな蛍光強度の低下を認めた。また、パネルビーズの反応性は、ほとんどの施設において差を認めなかったが、BB、PB で蛍光強度の低下が認められた 2 施設では、パネルビーズの蛍光強度においても全体的に低値を示した（Fig. 3～Fig. 6 上段）。しかしながら、ビーズ全体で蛍光強度の低下を認めたため、判定に用いる Index 値においては他施設との大きな差を認めなかった（Fig. 3～Fig. 6 下段）。このような極端なシグナルの低下の原因は、機器、あるいは操作手技の問題等が考えられることから、検査環境含めた検査手

順の再点検が必要と思われる。

1) 判定結果について

抗体の有無については、全施設で一致していた（Table 2）。Table 3～6 に、各施設のパネルビーズ毎の Index 値を、Table 7～10 に抗原ごとの判定結果を示す。LAB-Screen Single Antigen (LS-SA) で BNV 10,000 以上の強陽性となった抗原名をオレンジ色、5,000～10,000 の中等度陽性を緑色、2,000～5,000 の弱陽性を青色で示した。Table 3～6 に示す通り、各施設の Index 値は大きな差を認めなかったが、抗原毎の判定スコアに明らかな乖離を認めた（Table 7～10 の青枠部）。このような乖離の主因として、施設ごとのカットオフ値の設定の違い、あるいは判定の不備が挙げられる。また、Table 7～10 中の赤枠で示したように、ビーズセットに入っていない抗原について判定を行っている、あるいはビーズセットに入っている抗原の判定漏れといった単純なミスによる判定不一致例も多く認めた。

2) 判定不一致例について

判定スコアの不一致例について、いくつか例をあげて示す。Fig. 7 は施設ごとのスコア 8、つまり特定の抗原に対する抗体を陽性と判定した数を示しているが、赤枠で囲った 2 施設（施設番号 S28, S48）で突出していた。これらの施設では、判定スコア 4 をスコア 8 と判定しているなど、判定の方法が不適切であったと推測される。同様に、判定方法に不備があると思われるケースを Table 11～14 に示す。これらの表はビーズに対する各施設の Index 値、および抗原の判定スコアをまとめた表である。赤で示したセルが各施設で設定したカットオフ値上回っているパネルビーズであることを示している。また抗原名の色は LS-SA の BNV に応じて色分けしている。赤枠で示した施設において、種々の要因（カットオフ

値の考え方、ビーズの反応性の違い、記入ミス)により他施設との明らかな乖離が認められた。

3) 判定方法の再確認

今回の解析において、抗原表の見落としやパターンマッチングの勘違いと考えられる不一致を多く認めたことから、基本的な判定方法の再確認について述べる。

たとえば Table 15 のようなビーズの反応性がみられた場合、WAKFlow などのパターンマッチングによる判定方法は、まず各施設で設定したカットオフ値以下のビーズに含まれる抗原をスコア 1 と判定する (表中青部分)。次に、カットオフ値以上となったビーズのうちスコア 1 と判定された抗原を除外していき、反応が確認できた抗原のみをスコア 8 とする (表中赤部分)。判定不能と考えられる抗原が複数存在する場合 (表中緑部分) は、このパネルビーズのうちどの抗原と反応しているのか不明であることから、これらの抗原はすべてスコア 4 と判定すべきである。このように各ビーズの反応性とパネルビーズの抗原情報を丹念に見ていくことで各抗原に対する特異性の判定ミスや判定漏れなどを防ぐことができると考えられる。

4) HLA-C- ローカスに対する抗体検出の注意点

WAKFlow class I は HLA-C ローカスに対する抗体の検出感度が HLA-A 及び B ローカスと比較して低いことが以前から指摘されており、今回提出された血清においても同様の傾向がみられた。Table 16 は、HLA-C ローカスの特異性を持つ血清 SH2503 の施設ごとの反応パターンを表しているが、LS-SA において HLA-Cw6 及び 7 は BNV で 15,000 以上、HLA-Cw4 は 8,000 の力価の高い抗体であったが、WAKFlow MR class I では、ほとんどの施設において各施設で設定したカットオフ値を下回り検出が困難であった。しかし、一部の施設 (赤枠部) においては、カットオフ値を 2 付近まで下げることで、こういった HLA-C ローカスに対する抗体や弱い抗体の一部を検出できる可能性が示唆された。

このように、カットオフ値を下げることで弱い抗体の取りこぼしなどを最小限にすることが可能かもしれない。ただし、カットオフ値を下げることは、偽陽性を増加させる、つまり感度を上げることで特異度を犠牲にしているという側面があることに注意が必要と考えられる

3. WAKFlow-MR クラス II

クラス II においても抗体の有無についてはクラス I と同様に施設間の不一致は認めなかった (Table 17)。バックグラウンドビーズ (BB) ポジティブビーズ (PB) の蛍光強度の施設間差については、Lot. L0A を使用した施設 (施設番号 46) において BB の明らかな低値を認めておりロット差が疑われた (Fig. 8)。また、ビーズ毎の反応性、および Index 値も施設間差は認められなかったが、Index においては一部の施設で明らかな低下を認めた (Fig. 9 ~ 11)。また、抗原毎の判定結果においても判定スコアの明らかな乖離や判定ミスが認められた (Table 18)。詳細については学会ホームページを参照されたい。

4. まとめ

蛍光値の施設間差はほとんど見られなかったものの一部の施設で蛍光値が著しく低く、測定機器を含めた手技の点検が必要と思われた。

抗体スクリーニング結果は全施設で一致したが、特異性評価において、判定スコアに施設間差を認めた。これらの要因として、ビーズの反応性と判定スコアの整合性に不備があるケースが多く見受けられた。また、抗原表に記載のない抗原に対して判定を行っているなどの単純なミスも散見されており、抗原表から得られる情報を十分吟味し判定することが重要と考えられる。

カットオフ値の設定は、感度および特異度を勘案しながら、各施設の目的にあった判断を行うことが重要と考えられる。

第 17 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⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

1. その他検査法

ここでは、フロービーズを用いた LABScreen, FlowPRA 以外について報告する。LCT (AHG-LCT) 法 (3 施設), ICFA 法 (2 施設), MPFA 法 (4 施設) の 3 法を解析した。これらは、判定スコアに基づく評価は困難なため、測定データから反応パターンで解析した。LCT (AHG-LCT) 法は、C1qScreen (中央血液研究所で測定) の結果とほぼ一致していたが、一部で非特異反応が認められた。ICFA 法は LABScreen シングル抗原試薬 (各施設の測定結果) の検出感度と同等であった。測定条件の違いでは、MPFA 法の反応結果の差異が感作時間に関係すると思われた。

現在ではシングル抗原試薬が容易に使用できることから、これらセル・ベース・アッセイは不利な検査法と思われるが、個々の反応は検出感度に応じて実用性を認めた。これらは、クロスマッチに必要な不可欠な検査法であるため、今後も、高い技術水準を維持したい。

2. クロスマッチ

例年どおり、ダイレクトクロスマッチ (19 施設) と仮想クロスマッチ (16 施設) で実施した。参加施設は、毎年着実に増加している。

ダイレクトクロスマッチは、指定した抗体サンプル (SH2501) と各施設が準備する抗原細胞で検査し、LCT (AHG-LCT) 法 (6 施設), FCM 法 (7 施設), ICFA 法 (11 施設) の 3 法を解析した。前項「その他検査法」と同様な解析を行い、特に測定条件や測定基準の違いが結果に影響を与えるかどうか比較した。LCT (AHG-LCT) 法は、

判定基準が施設間で微妙に異なり、結果への影響が考えられるが、操作過程を評価する情報を得ていないため確実な解析はできなかった。FCM 法は、測定時のパラメータと判定基準が不統一なこともさることながら、細胞分離方法、散乱光ドットプロットの描き方、細胞測定数の違いに懸念を抱かせる。そこで、各施設の測定データを統一したパラメータ (GeoMean 値で SN 比を算出しスコア化) で再解析した。検出した抗体特異性はほぼ一致していたが、スコアに差異が認められ、これはグレーゾーンの抗体検出結果に影響することが十分予測された。ICFA 法は、測定条件や判定基準が高水準で統一化されているため、データの信頼性も高い。LABScreen シングル抗原試薬の特異性及び検出感度との一致性も高かった。

仮想クロスマッチは抗体サンプル (SH2501) に対して、2 本の DNA サンプル (H2503, H2504) を指定した。SH2501 × H2503 は、全て陽性判定で一致しているが、想定する反応抗原で数施設が異なる結果を示していた。SH2501 × H2504 は、判定結果に違いがあり、標的抗原に対する抗体の強さが十分でないことが結果に表れた。また、それが今回の狙いでもある。どちらも、DNA サンプルのタイピング結果に問題はないため、クロス判定結果や想定する反応抗原の違いは、明らかに抗体検査の精度に左右されたこととなる。以上、仮想クロスマッチはクロスマッチ自体の操作技術は介在しないが、そこに至るタイピングや抗体検査の精度を見事に反映している。今回の QC ワークショップ参加状況から、あと 17 施設が仮想クロスマッチに参加可能なことを付け加えておく。

第 17 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA-QC および結果評価—

石井 博之¹⁾

¹⁾ 近畿ブロック血液センター検査三課

1. はじめに

DNA-QC の参加施設については、66 施設あり、昨年 (53 施設) より増加した。部門別の参加施設数は臓器移植部門 41 施設、輸血部門 28 施設、造血幹細胞移植部門 26 施設、その他が 9 施設であり、そのうち 26 施設で重複がみられた。使用した 4 種類の試料については、「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 を配布した。

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。なお、詳細については、学会ホームページ「第 17 回 QC ワークショップ報告集」の参加部門別「DNA タイピング (表記法を含む)」を参照されたい。

2. 使用タイピング法について

使用タイピング方法については、SSP 法、SSO 法 (INNO-LIPA, Luminex)、SBT 法 (SS-SBT 法を含む) での参加があった。臓器移植部門では、SSP 法が 56.1% と一番高く、輸血、造血幹細胞移植、その他の各部門では SSO 法 (Luminex) の使用比率が高い状況であった。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。HLA ローカス別タイピング実施状況については、何れのタイピング方法においても、HLA-A, B 座は 100% 実施されていた。SSP 法、SSO 法 (INNO-LIPA) では、HLA-A, B, DRB1 座が 100%、SBT 法では HLA-A, B, C, DRB1 座が 100% 実施されていた。

3. 結果評価

3.1 概要

結果の評価については、「HLA-QC ワークショップ結果評価の基準」に基づき、①判定結果 (各タイピング方法での判定結果、総合判定結果)、②結果表記 (アレル表記、HLA 型への読替えと HLA 型の表記)、③試験・検査状況 (結果の妥当性、反応データ) の 3 項目について、HLA-A, B, C, DRB1 座を対象に評価を行った。

3.2 判定結果の評価

「判定結果」の評価点は、平均が 57.8 点 (基本評価点: 60 点) であり、昨年 (56.5 点) より高くなった。各施設の点数の分布を見ると、減点なしの 60 点の施設が 72.2% となっており、昨年より 10% 以上増加した。また、タイピング方法別の平均値もすべての方法で昨年を上回る結果となり、特に SBT 法については、平均 59.5 点と良好な成績であった。参加部門別で比較すると、輸血部門への単独参加施設では全体的に減点が多く平均 54.1 点、臓器部門単独参加の施設平均が 56.8 点と全体の平均値を下回っていた。

3.3 結果表記の評価

「結果表記」の評価点は、平均 38.7 点 (基本評価点: 40 点) であり、昨年と同じ点数であった。しかし、各施設の点数の分布を見ると 36 ~ 40 点の施設の割合が 89.4% と 16th QCWS の 94.3%、17th QCWS の 94.1% と比較して約 5% 減少しており、その分 31 ~ 35 点の施設の割合が増加していた。

3.4 試験・検査状況の評価

「試験・検査状況の評価」では「HLA タイピング実施時にみられた試験結果 (反応データ) 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 A, B, C で評価

している。

今回の評価結果と昨年の評価結果を比較すると、Luminex法のGenoSearchおよびSBT法以外の方法では、A評価が6～20%減少し、一部の反応データに不備が認められるB評価の割合が増加している。逆にSBT法については、すべての施設がA評価となった。またC評価と判定された施設は、昨年に引き続きなかった。B評価と判定された原因については、一部の反応データに不備（偽陽性や偽陰性等）があったためであるが、反応データの不備はアサインミス等の原因となるため改善が必要である。

4. 総合評価

総合評価点（判定結果の評価点+結果表記の評価点）の平均は96.6点とであり、昨年の平均点である95.3点を上回った。総合的な判定区分である総合評価点は、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」と評価している。A評価が34施設と50%を超えB評価は32施設であった。要改善が必要なC評価の施設はなかった。

総合評価点については、年々上向きであり、参加部門間の差も少なくなってきている。特に今回のQCWSは、参加施設が昨年より13施設も増加していることを考えると良好な成績であったと考える。

第 17 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. 部門別解析

1.1 概要

抗体 QC への参加は、輸血部門 27 施設、臓器移植部門 29 施設、造血幹細胞移植部門 21 施設（全て重複あり）で、昨年（16th）より 12 施設多い 49 施設（このうち初参加は 13 施設）となり大幅な増加を認めた。部門別参加の割合は、臓器、輸血、造血幹の順で多くこれまでの傾向と同様であったが、参加施設の構成については医療機関の参加率が著しく上昇し今年の 1.5 倍に増えた。これらの要因としては、クロスマッチにおいて臓器移植学会との共同企画があったことや、移植関連施設への広報活動による影響だと思われる。

また、抗体検査実施状況については、49 施設中 46 施設（93.9%）で蛍光ビーズ法による抗体検査を 2 法以上実施していた。また、昨年までの傾向と同じく試薬の使用状況が特定の部門に偏らない「均一化」の傾向が認められた。

1.2 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。昨年度（16th）は、IgM 抗体の特異性を有するサンプルが含まれていたこともあり 83.0%～100% と一致率にバラツキを認めたが、本年度は SH2503 のクラス II 抗体を除くすべてが一致率 100% と非常に良好な成績であった。一致率が 100% ではなかった SH2503 のクラス II 抗体の検出では、Consensus が抗体無（スコア 1）であるのに対して、2 施設が抗体有（スコア 8）としていた。これらの施設は抗体の有無についても LABScreen single antigen のみを用いて検査を実施したと考えられ、抗体検出における試薬の選択は慎重にしなければならない。

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 抗体では造血幹細胞移植部門および臓器移植部門が 100% であるのに対して輸血部門は 74.0%、Class II 抗体では臓器移植部門 96.6%、造血幹細胞移植部門 95.2% であるのに対して輸血部門が 92.6% と、一昨年と同様に輸血部門の抗体同定検査の実施率が低い傾向となった。

2. 結果評価

2.1 抗体 QC 結果評価について

これまでと同様に、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）」を基に、それ以上の構成比率を示す抗原を対象として評価点を算出した（それ以下の構成比率を示す抗原は対象外）。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。

2.2. 評価結果

1) 抗体検出については、A 評価（80 点以上）が 47 施設（95.9%）、B 評価（40～80 点未満）0 施設、C 評価（40 点未満）2 施設（4.1%）であった。ただし C 評価の 2 施設は「結果の記入漏れ」である可能性が高く、それを除けば全体的に良好な結果であった。一方、クラス II 抗体の検出について SH2503 が 100% 一致とならなかった原因は、抗体有と判定した 2 施設が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な反応を抗体陽性として判断したと考えられる。

2) 抗体特異性同定検査を実施した 37 施設中、評価 A が 28 施設（75.7%）、評価 B が 4 施設（10.8%）、評価 C が 5 施設（13.5%）となり、昨年よりも評価 A および B の施設が増加し、評価 C の施設が減少するという結果

であった。ただし、今年度より判定記入シートの内容を若干変更したこと、また初参加施設においては記入方法の理解不足が否めないことから本来の実力を発揮できていない可能性もあり次回以降の結果が期待される。

3) 今回、特異性同定の評価抗原について部門間での一致率をローカス別に比較した。A ローカスについては各部門とも100%一致していたが、B, C ローカスについては95~97%の一致率であった。特にC ローカス抗体の検査結果は他部門に比較して臓器部門で若干のばらつきを認めた。これは、技術的な差異というよりは、選択する試薬(C ローカス抗原が含まれないなど)によるものであり、部門による必要性(優先度)の違いを反映していると考えられた。クラスII抗体についてはDR・DQ ローカス共に一致抗原数に大差を認めなかった。

4) 抗体特異性同定検査の共通となる結果(Consensus Result)を比較対象として、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がスコア1であるのに対してスコア8である場合(暫定的に偽陽性とする)、その逆でConsensus Resultがスコア8であるのに対してスコア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、部門には偏らず全体的に偽陰性のパターンが散見されており昨年とは逆の傾向を認めた。

5) 抗体特異性同定まで行った35施設中34施設(97.1%)はHigh resolution試薬であるLABScreenやFlow PRAのsingle antigen, またはそれに準ずるWAKFlowを用いており、これら試薬の結果の違いが抗原別判定結果に影響していると考えられる。そこで今年度は方法別の結果比較を試み、以下に各試薬の特徴を踏まえた留意点を列記する。

① LABScreenの結果は参加施設内でよく一致しており、さらに総合判定の結果ともほぼ合致していた。その反面、総合判定結果の根拠となるので評価点を意識したスコアリングになる傾向も否めない。QCWSの本来の目的(検査精度の自己管理)に適うためにも特に陽性カットオフ付近のグレーゾーンでは日常的に自施設で用いる判断基準で判定し、その結果を他施設と比較するべきである。

② WAKFlowでの抗原別判定結果の一致率はほとんどのサンプルで70%以上と良好であった。ただし、Cロー

カス抗体については「1」と判定されやすい傾向がみられた。A, B ローカス抗体と複合で存在するC ローカス抗体の反応は、より慎重に判定する必要があるため自施設の判定方法についても再確認が必要である。

③ Flow PRAではsingle antigenを用いる施設数が少ないため特異性同定の一致率が低くなる傾向があった。C ローカス抗体については全施設で未検査であった。これらの施設はすべて臓器部門の単独参加であり、部門の特徴を反映していると考えられた。

3. 結語

17th QCWSの結果を総合的に判断すると、16th QCWSから引き続き参加施設の全体的な水準は一定レベルで維持されていると考えられた。ただ、部門間の結果には特筆すべき差異は認めないものの臓器部門は他部門と比較して評価点に若干のばらつきを認めた。また、18th QCWSに向けて再認識を要する事項を以下に挙げる。

1) 結果記入シート記載および提出についての注意事項

① 判定シートのスコアは全て集計される事を念頭において入力する。(選択した方法で判定不可能なものは入力しない。)

② 未使用シートの削除、測定データの添付、期限内の提出(差替えは受理しない)など日常的に成績書を提出するのと同様の姿勢で臨む。

2) 継続的参加の重要性

① 過去の結果との比較から全体的な検査精度は向上している。継続的に参加することで自施設の恒常的な精度管理が可能と考える。

② 同様の検査目的を持った他施設との結果比較ができる機会として活用されることが望ましい。

冒頭でも述べたとおり今年度はQCWS抗体部門史上で最も多い参加数であり、特に初参加の割合が26.5%と今後期待できる結果となった。参加施設数が増加するに伴いその解析結果はより現状を反映するものとなる。そこで結果評価の方法に関しても基準値(Consensus)の算出方法や、現状では明確な差異が認められない「部門別」という切り分け方などを今後の検討事項として協議し、参加施設と解析担当の相互的努力でさらに日常業務の指標となるようなQCWSを目指したいと考える。

第 17 回 HLA-QC ワークショップレポート【追加発言】 血液を用いた「クロスマッチ」の実施報告 —日本組織適合性学会 QCWS との連携—

橋口 裕樹¹⁾

¹⁾ 福岡赤十字病院 検査部 移植・輸血検査課

1. 概要

日本移植学会では、統一した全血サンプル由来のリンパ球を用いた交差試験（以下、「クロスマッチ」という。）の精度管理が必要だと思慮し、平成 25 年 4 月に日本組織適合性学会との連携により、試行的に実施する事となった。

2. 経過

日本組織適合性学会が開催する第 17 回 QCWS 参加施設は 72 施設で、その中 39 施設からの全血クロスマッチ参加申し込みがあった。使用したサンプルは平成 25 年 4 月 2～5 日に日本組織適合性学会 QCWS より配布された血清 4 本中、2 本を使用した。

その後、日本移植学会移植関連検査委員会より ACD-A 液入全血 7 ml を参加施設に配布した。到着後、直ちに T 細胞を分離し、クロスマッチを実施した。ACD-A 液入全血の発送には、宅配便（常温）で発送、全国の参加施設には翌日、翌々日には到着し、細胞分離に関して大きな影響は無かった。集計結果は各施設にメールにて報告し、9 月に開催された第 49 回日本移植学会、日本組織適合性学会第 17 回 QCWS で報告を行った。

3. 検査方法および試料選択について

検査方法は各施設で日常的に行っている方法を選択可とした。日本組織適合性学会 QCWS より配布されたサンプル血清の内、抗体の特異性より #2502 をクロスマッチ陽性、#2504 をクロスマッチ陰性になるように選択した。#2502 陽性検体は感度の一番低い CDC 法でも陽性になるよう設定した。検査方法を見ると CDC 法（27 施設）、AHG-CDC 法（7 施設）、FCXM（25 施設）、ICFA 法（11 施設）を使用し、半数以上の施設で複数の検査方法を使用しての結果報告であった。

4. 検査結果

一部の検査法を除き 90% 近い結果の一致率であった。不一致の原因はサンプル取違い、誤入力、判定保留があった。全体として概ね良好な結果であった。

5. まとめ

今回、初の試みとして全国規模の統一した全血サンプル由来のリンパ球を用いたクロスマッチを、日本組織適合性学会の協力のもと実施した。次年度も引き続き同様の形式の精度管理を予定、準備を進めている。これと併せて臓器移植検査に関わる検査方法の統一、マニュアル整備等も行いう事が急務であると考えられる。