

第19回 HLA-QC ワークショップレポート

第19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²⁾

¹⁾ 公益財団法人 HLA 研究所, ²⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 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. ワークショップの経過

平成27年1月に第19回 HLA-QCWS の開催および参加案内を, 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27年2月までに73施設 (DNA-QC: 69施設, 抗体 QC: 58施設) からの参加申し込みがあった (表1)。また, QCWS 参加希望施設からの連絡およびデータ収集等については, 電子メールを主として行った。

DNA-QC および抗体 QC に用いる試料の選択は, 第23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て行った。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。

3月31日に試料を発送し, 4月10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9日とした。最終的には73施設 (DNA-QC: 69施設, 抗体 QC: 57施設) から結果が提出された。5~6月中に生データの取りまとめ, 6月3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は, 7月15日に締め切りとし, 次に総合解析担当と各検査法解析担

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27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。同時にデータ集を CD-R で配布した。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, 昨年同様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学会の表記法に従って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」の要件に合う細胞から抽出した 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

[#] 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²⁾, 成瀬妙子³⁾, 高陽淑⁴⁾, 橋口裕樹⁵⁾, 一戸辰夫⁶⁾, 石塚敏⁷⁾, 太田正穂⁸⁾, 川井信太郎⁹⁾, 吉川枝里¹⁰⁾, 木村彰方³⁾, 黒田ゆかり¹¹⁾, 小林孝彰¹²⁾, 藤原孝記¹³⁾, 宮崎孔¹⁴⁾, 湯沢賢治¹⁵⁾

¹⁾ 公益財団法人 HLA 研究所, ²⁾ 日本赤十字社 中央血液研究所, ³⁾ 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態分野, ⁴⁾ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター, ⁵⁾ 福岡赤十字病院, ⁶⁾ 広島大学 原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野, ⁷⁾ 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室, ⁸⁾ 信州大学 医学部 法医学教室, ⁹⁾ 湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部, ¹⁰⁾ 東海大学 医学部 血液腫瘍内科, ¹¹⁾ 日本赤十字社 九州ブロック血液センター, ¹²⁾ 愛知医科大学 医学部 外科学講座, ¹³⁾ 帝京大学医学部 附属病院 輸血・細胞治療センター, ¹⁴⁾ 日本赤十字社 北海道ブロック血液センター, ¹⁵⁾ 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

表 1 第 19 回 HLA-QCWS 参加施設 (受付日付順)

		(受付日付順)
1	佐賀大学医学部附属病院	輸血部
2	INPO法人腎泌尿器疾患研究所	
3	中四国ブロック血液センター	検査一課
4	獨協医科大学病院	臨床検査センター 遺伝子・HLA検査室
5	鹿児島大学医学部・歯学部附属病院	輸血・細胞治療部
6	北里大学病院	輸血部
7	富山大学附属病院	輸血・細胞治療部
8	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部
9	九州ブロック血液センター	検査二課
10	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部
11	帝京大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター
12	東北ブロック血液センター	検査一課
13	岐阜大学医学部附属病院	検査部
14	公益財団法人 HLA 研究所	
15	鷹揚細腎研究所 弘前病院	HLA検査室
16	三重大学医学部附属病院	輸血部
17	熊本大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部
18	日本赤十字社 中央血液研究所	研究開発部
19	近畿ブロック血液センター	検査部 検査三課
20	虎の門病院	輸血部
21	株式会社ビー・エム・エル	第三検査部 ゲノム検査課
22	JCHO仙台病院	統括診療部 臨床検査科診療部
23	九州大病院	遺伝子・細胞療法部
24	株式会社 LSIメディエンス	遺伝子解析部 遺伝子検査グループ
25	東海北陸ブロック血液センター	品質部 検査三課
26	伊勢赤十字病院	輸血検査室
27	湧永製薬株式会社	試薬・診断薬事業部
28	徳島大学病院	輸血・細胞治療部
29	東海大学医学部附属病院	臨床検査技術科 輸血室
30	愛媛県立衛生環境研究所	疫学情報科
31	広島大学病院	診療支援部 遺伝子細胞療法部門
32	北海道大学病院	検査・輸血部
33	京都府立医科大学附属病院	輸血・細胞治療部
34	岡山大学病院	輸血部
35	静岡県立総合病院	検査部 輸血・細胞治療科
36	国立循環器病研究センター	臨床検査部 輸血管理室
37	関西医科大学附属桜花病院	輸血・細胞療法部
38	株式会社 医学生物学研究所	品質保証部
39	国立病院機構 岡山医療センター	臨床検査科
40	北海道ブロック血液センター	品質部検査一課二係
41	金沢医科大学病院	北陸腎移植HLA検査センター
42	東京女子医科大学	中央検査部 移植関連検査室
43	名古屋第二赤十字病院	医療技術部検体検査第二課組織適合検査室
44	公立大学法人 横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部
45	大分県立病院	輸血部
46	松江赤十字病院	検査部 輸血管理室
47	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
48	ジェノダイブファーマ株式会社	ゲノム解部門HLA検査課
49	株式会社 ベリタス	技術推進部
50	株式会社 保健科学研究所	QAU
51	富崎大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部
52	関東甲信越ブロック血液センター	検査部 検査三課
53	社会保険中京病院	検査部
54	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
55	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
56	山形県立中央病院	輸血部
57	がん・感染症センター 都立駒込病院	輸血・細胞治療科
58	岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部 免疫血清検査室
59	秋田大学医学部附属病院	腎疾患先端医療センター
60	沖縄県立中部病院	検査科 HLA検査
61	国立病院機構千葉東病院	臨床検査科
62	福岡赤十字病院	検査部 移植検査課
63	筑波大学	消化器外科研究室
64	旭川医科大学病院	臨床検査・輸血部
65	県立広島病院	臨床研究検査科
66	大阪府立大学医学部附属病院	輸血部
67	独立行政法人医薬基盤研究所	難病・疾患資源研究部 難病資源研究室
68	札幌北極病院	臨床検査科
69	株式会社エスアールエル	特殊検査部 特殊検査 J課
70	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部
71	近畿大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター
72	株式会社 リプロセル	技術部
73	湘南鎌倉総合病院	検査部

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抗HLA抗体であること」とし、一部の試料では「HLA-C座抗原に対する抗体」、「IgM性抗体」、「HLA以外の非特異的な反応」が含まれる場合がある。

交差適合試験については、本年も参加希望施設からの募集参加として以下の2通り実施することを参加申込み時に受け付けた。

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

また、全血由来のリンパ球による交差適合試験は、日本移植学会との連携しQCWSで使用する試料(血清)を使用して行った。

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(次世代シーケンサーを用いた方法も含む)、抗体QCでは①FlowPRA法、②Lab Screen、③WAK Flow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」に従った提出結果および結果表記法について評価を行い、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。また、今回のQCWS集会では試料の説明も加えた。

1) タイピング結果解析

- ・試料説明 総合解析(部門含む)
 - 九州ブロック血液センター 黒田ゆかり
 - ・Luminex(SSO法)について
 - ジェノダイブファーマ 奥平 裕子
 - ・イノリパ(SSO法)について
 - 東京女子医科大学 石塚 敏
 - ・SSP法について
 - 県立広島病院 藤井 明美
 - ・SBT法について
 - HLA研究所 小島 裕人

2) 抗体検査結果解析

- ・試料説明
 - 中央血液研究所 中島 文明
- ・総合解析(部門含む)
 - 近畿ブロック血液センター 高 陽淑

- FlowPRA 法の検査状況の解析
福岡赤十字病院 金本 人美
- LabScreen による抗体検査
東海大学医学部付属病院 杉本 達哉
- WAK Flow 法による抗体検査
中四国ブロック血液センター 平田 康司
- 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
- 移植学会連携 全血クロス
福岡赤十字病院 橋口 裕樹

一部は、日本赤十字社中央血液研究所で 1 本鎖 DNA に分離してから IMGT/HLA 3.19.0 (2015-01) を参照ライブラリーとして、塩基配列を再確定した。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、参加各施設の総合判定結果を集計し、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記載した。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 に達しない抗原として表示した。遺伝子頻度は造血幹細胞移植情報サービス (<http://www.bmdc.jrc.or.jp/generalpublic/statistics.html#an1>) で公開されている統計資料を参照した (表 3)。

各施設の提出結果の再確認、精度管理及び技術向上に、これらの結果とサンプル残余を活用していただきたい。

4. 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 サンプルは、主に参加各施設の SSO と SBT の結果から総合的にリアサインした。Ambiguity を可能な限り回避するため、

表 2 第 19 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	
H2701	A*02:06:01	A*11:02:01	B*38:02:01	B*48:01:01	C*07:02:01:01	C*08:03:01
	A2	A11	B38	B48	Cw7	Cw8
H2702	A*11:01:01	A*24:02:01	B*55:02:01	-	C*03:03:01	C*12:03:01
	A11	A24	B55	-	Cw9	Cw12 ※
H2703	A*24:02:01	A*26:01:01	B*15:27:01	B*46:01:01	C*01:02:01	C*04:01:01
	A24	A26	B62	B46	Cw1	Cw4
H2704	A*02:06/398	A*02:10/409	B*40:06:01	B*52:01:01	C*08:01:01	C*12:02:02
	A2	A210	B61	B52	Cw8	Cw12 ※

HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
H2701	DRB1*04:10 DRB4*01:03:01	DRB1*16:02:01 DRB5*02:02	DQA1*01:02/08/09/+ DQB1*04:02:01	DQA1*03:03/01/02 DQB1*05:02:01	DPA1*02:02 DPB1*03:01//+	- DPB1*05:01//+
	DR4 DR53	DR16 DR51	DQ4	DQ5	DPw3	DPw5
H2702	DRB1*04:05:01 DRB3*02:02:01	DRB1*14:05:01 DRB4*01:03:01	DQA1*01:04/01/04/05/+ DQB1*04:01:01	DQA1*03:03/01/02 DQB1*05:03:01	DPA1*01:03 DPB1*02:01//+	- DPB1*04:02//+
	DR4 DR52	DR14 DR53	DQ4	DQ5	DPw2	DPw4
H2703	DRB1*08:03:02	DRB1*09:01:02 DRB4*01:03:01	DQA1*01:03/10 DQB1*03:03:02	DQA1*03:02/01/03+ DQB1*06:01:01	DPA1*02:01 DPB1*05:01/135:01	DPA1*02:02 DPB1*14:01
	DR8	DR9 DR53	DQ9	DQ6	DPw5	DPw14 ※
H2704	DRB1*01:01:01	DRB1*15:02:01 DRB5*01:02	DQA1*01:01/04/05/+ DQB1*05:01:01	DQA1*01:03/10 DQB1*06:01:01	DPA1*02:01 DPB1*09:01	- -
	DR1	DR15 DR51	DQ5	DQ6	DPw9 ※	-

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 19 回 HLA-QC ワークショップレポート — 試料説明・総合解析（表記含む）（DNA 部門） —

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

I. 試料説明

1. DNA-QC のテーマ

DNA-QC のテーマは、1) 正確な DNA タイピングが行えること、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 となるアリルと日本人集団でのアリルの解説である。

2. 配布サンプル

配布したサンプルは、購入した細胞から抽出した DNA の 4 サンプル（10 µg, 20 µg）であり、日本人由来の細胞で高頻度に検出される HLA 型であることおよび日本人由来で稀な HLA アリルであることを選択基準とした。今回のサンプルの特徴は、日本人における典型的なハプロタイプを形成していないことと、抗原頻度では日本人で高頻度抗原であるが抗原内遺伝子頻度は稀であるアリルを含んでいることであった。

II. 部門別総合解析（表記含む）

1. 概要

参加施設は、昨年より 1 施設増加し 69 施設であり、部門別の参加施設数は、輸血部門 37 施設（53.6%）、臓器部門 44 施設（63.8%）、造血部門 30 施設（43.5%）およびその他 8 施設（11.6%）であった。評価対象は例年通り HLA-A, B, C および DRB1 とし、DRB3/4/5, DQB1, DPB1, DQA1 および DPA1 は対象外とした。ローカス別の参加施設数は、HLA-A および HLA-B が 69 施設（100%）、HLA-C が 59 施設（85.5%）、DRB1 が 67 施設（97.1%）であった。

使用方法は、Luminex（SSO）法を使用した施設（他

方法との重複含む）が全体の 72.5% と一番多かった。部門別にみても、いずれの部門でも Luminex（SSO）法を使用した施設が一番多かったが、輸血部門 81.1%、造血部門 83.3% であるのに対し、臓器部門では 65.9% とやや低く、その代わりに SSP 法の使用が 40.9% と目立っていた。

また、今回は NGS での参加施設が 3 施設あり、SBT 中の 1 方法として分けて方法別解析を行った。

詳細は、学会ホームページの第 19 回 QC ワークショップ報告集をご参照いただきたい。

2. 判定結果の評価

1) 各タイピング法での判定が正しいこと、2) 各タイピング法の結果が総合判定と祖語がないことの 2 つを評価項目とし、60 点満点で評価した。全施設の評価平均点は、58.59 点と概ね良好な結果を示した。各方法別解析を参考にさせていただきたい。

3. 結果表記の評価

HLA タイピング結果は、日本組織適合性学会で規定されている「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）」*¹ に基づき、1) アンビギュイティ（ambiguity）の表記、2) HLA 型への読替え、3) その他 DNA タイピング結果表記について 40 点満点で評価した。全施設の評価平均点は、39.51 点と良好な結果を示した。

*¹ : http://jshi.umin.ac.jp/standarization/JSJI-hyouki-2010_1.1.pdf

表記する際の注意点を以下に示すのでご参照いただきたい。

3-1 基本

- ① 全て半角で記入する。（アルファベット、数字、記号）

表 1 スプリット抗原, アソシエート抗原 (一部抜粋)

Allele	HLA 型	Allele	HLA 型	Allele	HLA 型
A*02:03	A203	B*27:08	B2708	B*55:07	B54
A*02:10	A210	B*38:03	B16	B*55:08	B56
A*24:03	A2403	B*39:01	B3901	B*56:06	B78
A*24:10	A2403	B*39:02	B3902	B*58:08	B17
A*26:10	A10	B*40:01	B60	C*03:02	Cw10
B*07:03	B703	B*40:02	B61	C*03:03	Cw9
B*15:01	B62	B*40:03	B61	C*03:04	Cw10
B*15:02	B75	B*40:05	B4005	DRB1*01:03	DR103
B*15:07	B62	B*40:06	B61	DRB1*03:01	DR17
B*15:11	B75	B*44:09	B45	DRB1*03:02	DR18
B*15:18	B71	B*51:02	B5102	DRB1*14:03	DR1403
B*15:27	B62	B*51:03	B5103	DRB1*15:08	DR2

- ② ローカス名は, HLA-A および B 以外は遺伝子型表記と HLA 型 (抗原型) とで異なる。(遺伝子型: 「C」「DRB1」, HLA 型 (抗原型): 「Cw」「DR」, など)

3-2 遺伝子型表記

- ① 遺伝子型はローカス名の後ろに「* (アスタリク)」を記入する。
- ② 各区域は「: (コロン)」で区切る。
- ③ 中・高解像度の検査法で実施した場合は, 第 2 区域以上で記入する。
- ④ Ambiguity がある場合は, 数字を小さい順に「/ (スラッシュ)」で区切る。
- ⑤ Null allele の「N」などは, スラッシュで区切る際には不要。

3-3 HLA 型 (抗原型) 表記

- ① 複数の型がある場合は数字を小さい順に「/ (スラッシュ)」で区切る。
- ② Null allele を含む複数の抗原型が存在する場合には「- (ブランク)」は不要。
- ③ 公認抗原型が無いアリルは, 第 1 区域を用いて表記する。(例: C*12:03 → Cw12)
- ④ 読替えは, 第 1 区域と HLA 型が異なる場合があるので要確認。[表 1 参照]

3-4 遺伝子型および HLA 型 (抗原型) 共通

- ① 明らかなヘテロ接合は両方のコラムに記入する。
- ② 明らかなホモ接合は後ろの 2 番目のコラムに「- (ブランク)」を記入する。

3-5 課題

年々増加するアリルであるが, 方法によっては表記が複雑化し, 今回のワークショップにおいても表記法での課題が見つかった。以下の点については, 標準化委員会に報告予定である。

- ① 第 3 区域で稀なアリル (A*02:01:101, B*54:01:02 など) が Ambiguity に含まれる場合に, 第 2 区域での表記がメジャーなアリルとなることにより, メジャーアリル同士の区別が出来ない表記となる。
- ② Phase ambiguity によって複数の組み合わせが存在する場合の「代表アリル」の規定が明確でないことから, 解答を示すことができなかった。

4. タイピング結果の評価 (総合評価)

総合評価は, 判定結果の評価 (60 点満点) と結果表記の評価 (40 点満点) の合計点であり, 全施設の平均点は 98.1 点と良好であった。総合評価点 60 点未満の施設は無く, 60 点以上 100 点未満が 28 施設, 満点は 41 施設であった。

5. 試験結果の評価

試験結果の評価は, 使用試薬での結果の妥当性を評価項目とし, 反応データについて A (不備無し), B (一部の不備), C (全体的な不備) の 3 段階で評価を行った。C 評価はなかったが, B 評価が 8 施設あり技術的なデータの確認をお願いしたい。

III. まとめ

DNA-QCにおける今回の各参加施設の結果は、全体的に良好な結果が得られていた。

正しく結果を報告するためには、「正確なタイピング」

と「正しい報告」が必要である。「正確なDNAタイピング」は、方法別解析報告をご参照いただき確認していただきたい。また、「正しい報告」には、自施設の使用試薬の原理や解像度およびそれらから導かれる結果やAmbiguityについても十分に理解しておく必要がある。

第 19 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—

奥平 裕子^{1,2)}

¹⁾ ジェノダイブファーマ (株), ²⁾ 東海大学医学部

1. 概要

19 回 DNA-QC に参加した 69 施設の内, Luminex 法での参加施設は 50 施設で, 前年より 7 施設増加していた。タイピングに使用された試薬キットは, LABType (OneLambda) 1 施設, LABType HD (OneLambda) 5 施設, Geno Search (MBL) 5 施設, WAKFlow (湧永製薬) 32 施設であった。また LABType+HD が 5 施設, LABType+WAKFlow が 1 施設, LABTypeHD+WAKFlow が 1 施設の使用となっていた。

タイピングの対象となったローカスは, HLA-A, -B 座は全施設で実施されていたが, 他のローカス組み合わせでは, HLA-A, B, DRB1 座の 3 座が 48 施設, HLA-A, B, C 座の 3 座が 43 施設であった。また, HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 の 6 座のタイピングを実施していた施設は 10 施設に留まった。

2. 解析方法

各施設からの報告結果で判定が異なった理由について, 以下の 3 点について事例を示した。

- 1) キット, ロット間差
 - ①各キットの比較
 - ②ロット間差の例
- 2) 判定結果の表記
 - ①全ての候補アレルを対象とし, 表記法に基づいて表記
 - ②第一区域が異なる組み合わせ
 - ③両方のカラムに同じアレルを表記
 - ④コメント欄の活用
- 3) プローブの反応性
 - ①実際の例

- ②カットオフ値の変更状況
- ③陽性コントロールピーズの蛍光値とばらつき
- ④ Pmin/Nmax 値の比率

詳細は, 学会ホームページに掲載されている「第 19 回 QC ワークショップ報告集」を参照のこと。

3. 解析結果および考察

- 1) キットは各キットの特性を理解した上での使用が望まれ, また新しいロットには新たにプローブが追加されるなど改良がなされていることもあるので注意が必要である。
- 2) 表記は, 全ての候補アレルを対象とし, 表記法に基づいた表記が必要である。また, 表記法の問題点も浮き彫りになった。第 3 区域でマイナーアレルが区別できないために, 第 2 区域でみた場合, メジャーアレル同士の区別が出来ない表記になってしまう。(H2704 検体の HLA-A で A*02:01 と A*02:06 の問題)
- 3) 反応データの確認には, 各施設から提出された CSV ファイルを用いた。

明らかな誤判定があった検体は H2704 検体の A ローカスのみであった。誤判定をしていた施設は 4 施設でそのうち 3 施設は, プローブの反応性に問題があり誤判定となっていた。これらの施設については, 手技等の見直しが必要であると考えられた。

また, 残りの 1 施設はプローブの反応性に問題はないがカットオフ値の変更により, 誤判定となっており, カットオフ値変更による, 誤判定の可能性について注意することが必要である。H2701 検体の A ローカスにおいて, ある施設では 7 つのプローブのカットオフ値の変更により, アレルタイプの判定を行っていた。これは私擬的で

あると言え、判断基準の見直しが必要だと考える。

また、複数の施設で同じプローブのカットオフ値の変更をしているのが見受けられた。これらのプローブについては注意が必要といえるかもしれない。

陽性コントロールビーズの蛍光値は4検体で同程度であることが期待され、ばらつきが少ないほど安定しているといえる。1施設のAローカスで%CVが50%を超えたが、概ねどの施設もばらつきが少なく安定した結果が出せているといえる。またPmin/Nmax値の比率では、プローブの陽性、陰性がはっきりしているかが分かる。10以上が望ましく、3以下ではカットオフ値の適切な設定が困難となり注意が必要だが、こちらも10以上が大半を占め、施設間差は大きくは認められないが、キット

間差は若干認められた。

4. まとめ

「正確なDNAタイピングが行えること」がDNA-QCの最大のテーマである。正確なタイピングを行うためには、安定した手技や解析時の正確な判断、HLAに関する知識が必要となる。また、年々増加するアレルに対応して必要があり、常に新しいHLAアレルの情報を収集しておかなくてはならない。誤判定をした施設のみならず、QCWS参加各施設では、もう一度解析データの見直しをし、改善すべき点がないか検討をすることが誤判定を防ぐためにも必要だと考える。

第 19 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) —

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. 参加状況

INNO-LiPA (Line Probe Assay) 参加施設は、昨年度 4 施設であったが本年は 2 施設に減少した。内訳は、2 施設共に臓器移植分野で 1 施設が LABType HD 併用と INNO-LiPA 単独の施設参加であった。

2. 検査状況

2 施設共に INNO-LiPA HLA-A Update. INNO-LiPA HLA-B Update Plus. INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus キットの 3 ローカスによる結果報告であった。

3. Line Probe 反応結果

2 施設による HLA-A.B.DRB1 ローカスのスコア化データを比較すると概ね良好な反応性を示していた。しかし、HLA-A ローカスの No.23 Probe 陽性反応が 2 施設共に弱い傾向が見られた。

詳細な反応結果については、学会ホームページに掲載されている「第 19 回 QC ワークショップ報告集」を参照して頂きたい。

4. 解析結果

INNO-LiPA は、中解像度 (medium resolution) 測定試

薬であるため、学会の表記法としては第 2 区域まで表記することを推奨している。また、全ての候補アレルを対象とした表記法に基づいた表記が必要である。そのため、判定には LiRAS for LiPA HLA v6.00 判定ソフトを使用し、日本人に限定した早見表の判定シートは用いない。

詳細な解析結果については、学会ホームページに掲載されている「第 19 回 QC ワークショップ報告集」を参照して頂きたい。

5. 考察

昨年同様、日本人に限定した解析結果と思われる施設があった。そのため、HLA-A.B.DRB1 ローカスのスコア化データが同様であっても日本人に限定したため、本来第 1 区域の抗原型が確定できないサンプルも確定された解析結果となっており、また明らかに ambiguity の異なるアレルであっても第 2 区域が同じであるため他方を Blank 表記された解析結果もあった。

学会の DNA-QC 表記法は、日常の DNA タイピングで使用している試薬の解析結果が公認されたアレル全てに対して可能性のある組合せを結果として表記することであり、もう一度確認して頂きたい。

第19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22施設（全参加施設の約32%）であり、昨年より8施設減少していた。このうち、SSP法のみでの参加施設は18施設（昨年比4施設減）、その他のタイピング法との併用施設は4施設（昨年比4施設減）であった。

2) 参加部門

参加22施設中19施設は臓器移植部門の参加（他部門重複含む）であり、SSP法での参加においては臓器移植部門が多い傾向は継続している。また、臓器移植部門のみでの参加は11施設であり、このうち9施設はSSP法のみでの参加であった。

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4種類、中解像度（medium resolution）試薬3種類であった。SSP法のみでの参加18施設のうち1施設は中解像度試薬も使用していた。他のタイピング法との併用参加施設においては低解像度試薬の使用は2施設、中解像度試薬の使用は3施設であり、他のタイピング法結果の確認方法としてSSP法を実施、報告されていると思われる。

使用試薬はMicro SSP（One Lambda社）の使用率が高く、中でも日本人向けに開発販売されたMicro SSP JPNは18施設（SSP法参加施設の82%）で使用されていた。

2. 解析結果および考察

解析はConsensus Allele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祖語がないこと」、「3. 相対的反応データに不備(false

positiveまたはfalse negative)がないこと」をチェックした。結果の詳細は、学会ホームページに掲載されているので、そちらを参照していただきたい。

1) 判定ミス (miss assign)

判定ミスの要因は反応の不備（false positive, false negative）によるものであった。判定ミスは同施設の複数検体で報告されており、検査方法や手技の見直し、検査結果の確認など原因の究明が必要と思われる。

判定ミスではないが、ambiguityを正しく判定できていない施設も散見された。Ambiguityは解析ソフトの未使用では正しく判定できない可能性が高くなる。解析ソフトは、判定結果の正確性、また客観性の観点からも必ず使用し、またバージョンアップ等最新のデータを採用する必要がある。

2) 相対的反応データの不備

相対的にfalse positiveを認めた施設は2施設、false negativeを認めた施設は2施設、両方認めた施設は1施設であった。反応データの不備があったすべての施設で判定ミスも認められた。SSP法の判定は、電気泳動による泳動像を正しく読み取る必要がある。プライマーバンドを陽性バンドと読み間違えるとfalse positiveとなるため、陽性バンドはサイズを確認して読み取る必要がある。なお、本年度は反応データのスコア化における問題は見られなかった。

3. まとめ

本年度のSSP法の結果は、概ね良好であったが、クラスIにおいては、反応データの不備による判定ミスが目立った。SSP法は操作が簡便であり、他の方法に比べて判定までの時間が短い、などの特徴がある。しかし、検査のプロトコルは忠実かつ慎重に行う必要がある。

また、電気泳動用ゲルの正しい作成や泳動像の判読も重要であり、解析ソフトの使用も必要と考える。

従来からの指摘事項ではあるが、SSP法に参加している多くの施設では低解像度試薬（第1区域までの判定試

薬）を使用しており、第2区域での判定の場合は多くの ambiguity が生じることとなる。このことは、判定や結果報告時に困難が生じることとなるため、今後も報告時の記載方法等検討が必要と思われる。

第 19 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—

小島 裕人¹⁾

¹⁾HLA 研究所

1. はじめに

昨年度と同様に、NGS (Next Generation Sequencing) 法と Sanger 法の 2 法に大別された。これらの方法論は異なるが、塩基配列を基本とした HLA 遺伝子型検査として研究分野以外での利用価値は現状では同等である。

NGS 法の最初の検査行程は、対象領域の遺伝子を PCR によって増幅させ、断片化などの操作を経て一定の長さに揃えることである。次にこれらの遺伝子増幅産物を測定機器で読み取り、最終的に既報のアリル配列を参照配列としてアライメントを行ってタイプを決定する。対象領域の遺伝子長によってその後の作業や得られる情報量や精度が異なり、ある程度短い断片を対象とする Short-range と、イントロンを含む幅広い領域を対象とする Long-range に分けられる。Short-range は断片化の作業がないのでルーチン化に向いているが、設定領域が複数の場合には exon 間の phase ambiguity を考慮に入れる必要がある。一方で Long-range は SS-SBT 法 (Super high resolution for single molecule-sequence-based typing method) に代表されるように、HLA 抗原をコードする全遺伝子領域を一度に増幅させることで ambiguity のない究極のタイピングを実現している。現状ではルーチン化は難しいが、作業工程の自動化が進んでおり、将来的には実現可能と考えられる。

Sanger 法は各 Exon (例: Class I 領域の場合 Exon 2, 3, 4) の遺伝子を PCR 増幅し、Exon ごとに F 側, R 側に特異的なプライマーを起点とした伸長反応を行う。この際に用いる dNTP には蛍光物質が付加されているものが混合されており、伸長反応のストッパーの役割を担う。反応が止まった遺伝子断片の塩基の長さの種類を解析することでタイプを決定する。

解析ソフトは、Sanger 法は Kit に対して推奨のソフトウェアを利用するのが標準である反面、NGS 法では解析方法の考え方が多く存在するため、タイピングキットとは別に開発しているメーカーも多い。

2. 参加施設・使用キット

今年度の参加施設は NGS 法が 3 施設、Sanger 法が 4 施設であった。

NGS 法は、1 施設は Long-range である自家製キットを Ion PGM シークエンサーを用いて測定し、判定ソフトは TypeStream と SeaBass を併用していた。残りの 2 施設は測定機器として MiSeq を測定機器としており、検出キットとして 1 施設は Short-range である Miseq class I+class II kits (Cisco genetics) を、もう 1 施設は Long-range である TruSight HLA (Illumina) を用いて、判定ソフトはそれぞれ専用のものである GeMS_HLA, Conexio Assign を使用していた。

Sanger 法での参加のあった 4 施設は、全施設が AlleleSEQ HLA typing Kits (CELERA) を使用していた。また、アリル判定の解析ソフトは、SBTengin が 2 施設、Assign が 2 施設で使用されていた。

3. 結果及び考察

1) NGS 法

① プライマー設計位置多型による ambiguity

H2701, H2704 の HLA-DRB1 が 1 施設で DRB1*16:02/22 および DRB1*15:02/19 と第 2 区域の ambiguity を絞り込めなかった。原因は該当施設で用いられた Kit が、これらのアリルの違いを区別する codon 6 にプライマーを設計しており、アリルの絞り込みが出来なかったことである。

NGS 法を用いた HLA タイピングキットは多くのメー

カーが開発をしており、プライマー設計位置も多種多様であるので、事前に確認をするのが望ましい。

② exon 間の ambiguity

H2702 の HLA-DPB1 は Short-range を用いた 1 施設で exon 間の ambiguity となる HLA-DPB1*02:01:02, DPB1*04:02:01:01/02 の組み合わせと HLA-DPB1*416:01, DPB1*105:01 の組み合わせを絞り込むことが出来なかった。この問題を回避するには exon 2 と exon 3 の間に重複領域を設けたプライマー設計をするなど、Kit の改良が必要であると考えられる。

③ 参照配列の更新

H2703 の HLA-DPB1 は 2 施設で HLA-DPB1*05:01:01, *14:01 と報告があったが、最新の参照配列情報は DPB1*14:01:01 と DPB1*14:01:02 が区別されているため、絞り込みが可能である。参照配列はだいたい 3 ヶ月おきに更新されるため、特に他の検査法よりも高い解像度の期待できる NGS 法では、定期的な更新が必要である。

2) Sanger 法

① codon 86 における ambiguity の絞り込み

H2701, H2702 の HLA-DRB1 は 2 施設で HLA-DRB1*04:05/10, *16:02/23 および HLA-DRB1*04:05/10, *14:05/44 の ambiguity を絞り込めていなかった。これらの ambiguity は codon 86 に起因するものであり、AlleleSEQR HLA typing Kits では付属のプライマーの使用で区別可能である。日本人における遺伝子型頻度は DRB1*04:05 が約 13%, DRB1*04:10 が約 2% であり、これらの ambiguity を絞り込むことは非常に重要である。

② プライマー付近の反応性

1 施設において、H2701 の HLA-DQB1 が HLA-DQB1*04:02/13, *05:02/83, また、H2703 の HLA-B は HLA-B*15:27:01, *46:01/60 と報告があった。それぞれのアレルの違いは HLA-DQB1*04:02/13 は codon 187, HLA-DQB1*

05:02/83 は codon 94, HLA-B*46:01/60 は codon 6 にあり、プライマー設計位置付近の検出の不安定さが原因と考えられる。プライマー設計位置付近はピークが微弱になったり、重なりが生じやすいため、判定困難となった場合は前処理や機器のコンディショニングを再確認するのが望ましい。

4. まとめ

今年度の参加施設は NGS 法が 3 施設、Sanger 法が 4 施設であった。

NGS 法は各施設で HLA タイピングキットが異なり、1 施設は Short-range, 2 施設は Long-range であった。Short-range を用いた施設では HLA-DPB1 で exon 間の ambiguity を絞り込めない検体があり、Long-range は、ambiguity のない究極のタイピング法を実現した結果となった。どちらの手法においても、プライマー設計位置の確認や参照配列の定期更新などに注意が必要である。

Sanger 法は各施設で同じ HLA タイピングキットを用いていたが、解析ソフトは 2 種類を各種につき 2 施設が使用していた。解析ソフトの特性による結果の違いは見られなかったが、DR 座の codon 86 に由来する ambiguity を解消するための付属キットの使用をしていない施設では、日本人頻度がそれぞれ約 13%, 約 2% となるアレルである DRB1*04:05 と DRB1*04:10 を区別できなかった。技術的な面では、プライマー設計位置付近の反応性が不安定であることを知っておく必要がある、判定困難な場合は前処理操作や機器のコンディショニングを確認して、再検査するのが望ましい。

SBT 部門においては Sanger 法もさることながら、多種多様な NGS 法では他方との精度の違いを確認する点においても、QC ワークショップへの積極的な参加が必要である。

第 19 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 試料説明—

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

本年度から、検査法別解析の冒頭に試料説明を加えることになった。抗体サンプルは、かつて LCT 法で血清学的に HLA タイピングするために、日本赤十字社で約 20 年間に 100 万人以上の献血者からスクリーニングして収集した抗血清から選定している。これらのうち、約 300 種類の抗血清を学会から日本赤十字社に譲渡依頼の手続きを済ませ、QCWS 用に確保してある。

基本的には、血清 4 サンプルを 1 mL ずつ配布すること、日本人に通常検出される HLA 抗体であること、一部の試料では、HLA-C 座抗原に対する抗体、IgM 性抗体、HLA 以外の非特異反応が含まれる場合があるといった要件で選定し配布している。さらに、解析上の利点、将来的な施設認定、アンケートでの要望を考慮し、次の 4 点も満たすよう努力目標としている。

- 抗体保有者の HLA 型が調べられていること
- 過去に採用した特異性を極力避ける
- HLA-Class I 及び Class II 特異性が含まれる
- 検査法により特異性に差が生じる血清を選ぶ
選定作業は、既に判っている LCT 法の特異性を出発

点として、精製 HLA 抗原試薬や細胞を使用するさまざまな検査法で確認しながら決定していく。また、使用する抗体サンプルの多くは献血者由来の血漿であるため、一定の手順で血清化してある（学会ホームページ QCWS レポート参照）。現状、日本移植学会で実施する全血クロスマッチの抗体サンプルも一部共通に配布している。

今回選定した抗体サンプルは、全て明確な特異性を示すが、細胞で反応しない特異性も併せ持つものを選んである。また、SH2701 のクラス II 特異性は、DR 陰性でかつ DQ、DP 特異性を保有し、その DP 特異性が細胞と反応することが確認できている。さらに、SH2701、2702、2704 は、ICFA 法クラス I の 2 種類のピーズでそれぞれ異なる反応を認めることを確認してある。

これらは全て、健常者由来の抗体であるため、実際に臨床上遭遇するさまざまな患者由来の抗体と何かの違いがあるかもしれない。しかしながら、QCWS の主目的は、検査手技を検証することであり、配布するサンプルの性状が明確に調べられ、十分量確保できていることで実施しているため何ら問題ないと考える。

第 19 回 HLA-QC ワークショップレポート — 総合解析 (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. 総合解析 (部門含む)

1.1 概要

抗体検査への参加は、輸血部門 34 施設、臓器移植部門 33 施設、造血細胞移植部門 25 施設 (全て重複あり) で昨年 (18th) より 6 施設多い 57 施設 (初参加は 5 施設) であった。施設別にみると血液センター、検査センターおよびメーカーの参加はここ数年変動がないが、病院・大学に属する施設では年々増加の傾向にある。この要因として臓器移植学会とのコラボ企画 (クロスマッチ) の影響と推測したが、実際は初参加のうち 3 施設は輸血単独、1 施設は全部門参加であった。また部門別の参加構成を調査したところ、全部門への参加は 12 施設、単独部門への参加は 28 施設 (輸血 12、臓器 16) で、造血部門には単独参加は無かった。

1.2 抗体検出結果

全部門での抗体検出 (抗体有無) 結果の一致率を見ると、SHS2701、SH2702、SH2704 はクラス I、II とともに 100% 一致であったが、H2703 ではクラス I 抗体 (一致率 98.2%)、クラス II 抗体 (一致率 96.2%) とともに一部の施設で不一致となった。この原因としては、判定シートへの記載ミスや不適切な検査によるものと考えられた (検査方法別解析結果参照)。

1.3 抗体特異性同定検査実施状況

抗体特異性同定の実施率 (実施数 / 参加数 × 100) を比較すると、全参加施設でクラス I 抗体は 77.2% (昨年は 72.5%)、クラス II 抗体は 66.7% (昨年は 58.8%) と昨年よりも全体に実施率が上昇していた。一方、部門別に比較すると、クラス I 抗体では臓器部門 (72.7%) が、クラス II 抗体では輸血部門 (67.6%) が若干低い傾向にあった。これは昨年同様、検査の必要性 (あるいは優先

順位) が部門では異なることを反映していると考えられた。

2. 結果評価

2.1 抗体 QC 結果比較について

各施設から提出された総合判定結果について一致状況を調査した。具体的には、検査対象抗原毎に判定スコア 4 (保留) 以外のスコア (1 or 8) を集計し、全施設で完全に一致したものを「完全一致抗原」としてその割合を求めた。次に、完全一致にならなかった抗原あるいはどのスコアにも取束しない (Consensus が得られない) 抗原については、各施設の判定結果および測定データを比較し不一致の原因を類推した (サンプル毎の詳細は学会 HP を参照のこと)。

1) 一致率:

ローカスごとに日本人遺伝子 0.1% を区切りとして、各施設の一致率を比較した。クラス I については、4 サンプルともに一致率 50% を切る抗原が存在したが、これは特定のローカス (抗原) にバラツキが偏っているという事ではなく、複数の要因があると考えられた (詳細は後述)。クラス II については、SH2702 において DQ 抗体の一致率 (28.6%) が極端に低かったことを除いては概ね高かった。

2) 結果不一致の原因:

不一致の原因を調査したところ、以下の 5 種類に大別されると考えられた。

- ① 試薬の問題…血小板抗体検出用キットや反応パターンで判定するキットでは抗体特異性の同定が困難になる場合があった。
- ② 測定の問題…他施設と比較してシグナルが全体的に低い施設や、一部のサンプル (一部の抗原) で

異なった反応性を示す施設があった。

- ③ 判定の問題…同一の試薬・同程度の反応であっても他施設と判定基準が大きく異なる施設や、データの蓄積が不十分であることから判定の整合性が取れていない施設があった。
- ④ その他…正しい測定値にも関わらず、結果判定時の勘違い（判定用ファイルの選択ミスも含む）や提出シートへの誤入力を起こしてしまう施設があった。
- ⑤ LABScreen single antigen (LSSA)での BNV (Baseline Normalized Value) が 1.000 ～ 2.000 の付近であると僅差で判定が 1 か 8 に分かれる。

3) 結果の不一致を是正するための対応策：

原因が、測定や判定等に原因がある場合（上記の②③④）は、自施設の測定値を再度確認した上で、作業手順の見直しをすることで改善される。

しかし、⑤については単体の施設で解決することは難しい。なぜなら、現在、LSSA を用いる多くの施設は陽性判定の Cut Off 値を BNV \times 1.000 前後に設定しているが、この反応帯は最も測定値が揺らぎやすいところであり、判定結果に齟齬が生じるからである。今後は全部門共通ではなく、検査の目的（部門）に応じて Cutoff を設定するか、新たに Cut Off 値の指標となり得るものを検討する必要がある。

2.2 抗体 QC 部門別評価について

日本人 HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の HLA 抗原（結果シートに太字で記載）について、基準値（0.67）以上の構成比率を示す抗原のみを対象として評価点を算出した（評価点の計算方法は学会 HP に掲載）。

2.3 評価内容

- 1) 参加施設 57 施設のうち、抗体検出については、A 評価（80 点以上）が 55 施設（96.5%）、B 評価（40

～ 80 点未満）および C 評価（40 点未満）はいずれも 1 施設（1.8%）であった。B, C 評価となった原因は記載漏れや誤入力であった。

- 2) 抗体特異性同定検査を実施した 44 施設中、評価 A が 39 施設（88.6%）、評価 B が 3 施設（6.8%）、評価 C が 2 施設（4.5%）であった。評価 B 以上の施設は、昨年（18th）が 86.5% であったが、今年は 42 施設（95.5%）となり昨年以上に良好な結果が得られた。

3. 結語

今回の QCWS（抗体部門）は初参加も含めて昨年以上の参加数であったが、抗体の検出や特異性同定検査のいずれにおいても高い一致率が得られた。これは、昨年までの傾向と同様に特異性同定検査をする際の使用試薬が集約化されてきたこと、それに大部分の施設が陽性判定の Cut Off 値として MFI : 1,000 ～ 2,000 に合わせてきたことが最大の要因と考えられる。

その一方で方法別の解析結果でも判明しているように、この反応帯は施設間差が最も大きいところである（方法別解析結果参照）。検査手技はもとより機器間差、検査日差など些細な要素でもバラツキがでるところであるため、参加施設が現状のまま CutOff 値を設定する限りは全ての結果が（全施設で）完全一致になることは難しい。

本来、QCWS とは自施設の検査精度を管理するために存在するものであり、参加施設は他施設との完全一致を最終目標にしているわけではない。しかし少なくとも目的（部門）が同じ施設間では同等の結果を得られるような判定基準の設定について議論することは重要であると考えられる。

第 19 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—

金本 人美¹⁾

¹⁾ 福岡赤十字病院 検査部 移植検査課 / 輸血細胞治療部

1. はじめに

第 19 回 HLA-QCWS での HLA 抗体検査で OneLambda FlowPRA 法を使用した施設は、スクリーニング検査で 24 施設であった。シングルアンチゲン検査は近年、Luminex を用いた試薬への移行が進み、今年は参加数が 0 であった。参加部門別の内訳（重複含む）は、臓器 19 施設、輸血 9 施設、造血 8 施設と前年度と大きな変化はなく、臓器移植施設での参加が多い状況であった。

2. 試薬キットと測定機器

スクリーニング試薬は、クラス I のロットは 24 施設中 23 施設で Lot.16 を使用しており、残り 1 施設は期限切れの Lot.12 を使用していた。クラス 2 のロットは、23 施設中 6 施設で Lot.18、14 施設で Lot.19 を使用しており、3 施設は（期限切れ）の Lot.9、Lot.17 を使用していた。

測定機器は、ベクトンディッキンソン社 12 施設 (FACS Calibur 7 施設, Canto2 5 施設) とベックマンコールター社 12 施設 (Navios 6 施設, FC500 4 施設, EpicsXL 2 施設) であった。

3. 解析方法

各施設からの報告データをもとに判定スコアの一致率を求めた。またフローサイトメトリー解析ソフト kaluza 1.3 を使用し各施設からのデータの再解析を行った。

4. 解析結果

配布サンプルは、クラス 1 は全て陽性、クラス 2 は SH2703 以外全て陽性であった。判定スコアの一致率は、クラス I, II ともに 100% と良好だった。しかし、%PRA の数値は同一条件（機器、試薬が同一）であっても施設により大きく違う箇所を認め、機器設定やマーカー設定で %PRA の数値は大きく変動していると考えられる。今回、参考資料として機器設定手順を加えた。ゲートの位置や、コンペンセーションの設定でビーズを取り込む数や、ヒストグラムが変化しその結果、%PRA にも影響を及ぼすと思われる。尚、測定機器別、陰性コントロールの Lot 別にも集計、解析を行ったが、SD、CV 等に有意な差は認めなかった。詳しくは、学会ホームページの解析資料を参照して頂きたい。

5. まとめ

FlowPRA 試薬を用いた検査の検出一致率 100% は、前年度同様、良好な結果であり、問題は認めなかった。しかし、例年の如く、%PRA は各施設において差を認めており、各施設でゲートの位置やコンペンセーションが適正か否かを確認することが必要であると考え。各施設、再度機器設定の見直しを行い、不明な点に関してはメーカーに問い合わせ、正しい機器設定の元、次回の QCWS に参加頂きたい。

第 19 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—

杉本 達哉¹⁾, 土田 文子¹⁾

¹⁾東海大学医学部附属病院 臨床検査技術科 輸血室

1. はじめに

抗体 QC 参加申込 58 施設 (抗体 QC 参加取止め: 1 施設) で LABScreen を利用した参加申込は 38 施設 (65.5%) であり, 抗体 QC 参加申込として最も多い方法であった。LABScreen 参加 38 施設のうち DNAQC 参加は 36 施設であり, クロスマッチ参加は 21 施設であった。LABScreen での抗体 QC 参加およびクロスマッチ参加は昨年度より増加を認めた。部門別参加状況では輸血関連 23 施設, 臓器移植 23 施設, 造血幹細胞 19 施設, その他(メーカー) 2 施設であった。参加施設毎でこれらの部門に複数関与して参加されている施設は 68.4% であった。LABScreen Single Antigen (SA) のみでの参加は 4 施設であった。

2. 結果解析

1) 抗体の有無

Class I の H2701, H2702, H2703 および H2704 の抗体の有無について参加 37 施設の全施設で抗体ありと判定された。Class II では H2701, H2702 および H2704 の抗体の有無について参加 34 施設の全施設で抗体ありと判定された。Class II の H2703 における抗体の有無については 33 施設で抗体なしと判定され, 1 施設で抗体ありと判定された。

2) カットオフ設定

カットオフ設定の確認の結果, 施設毎に様々なカットオフ設定がなされており, 確認できたカットオフ値設定は ① 500 ② 1000 ③ 1500 ④ 2000 ⑤ 5000 (C のみ) ⑥ default の 6 種類であった。

3) PC/NC 比

各施設から提出された生データより再解析で得られた

PC/NC 比 は SA の Class I が SH2701 で 33 ~ 552, SH2702 で 61 ~ 1141, SH2703 で 8 ~ 904 および SH2704 で 25 ~ 415 であった。SA の Class II では SH2701 で 45 ~ 1031, SH2702 で 192 ~ 1404, SH2703 で 20 ~ 1869 および SH2704 で 204 ~ 1511 であった。また, サンプル測定時におけるサンプルの前処理は, 前処理実施なし, 非特異反応吸着処理, EDTA 添加, DTT 添加, 凍結解凍後遠心処理, フィルターろ過およびこれらを複数組合せ実施している施設があり, その処理方法は様々であった。

4) 各施設データ比較 (SA)

SH2701 の HLA-A 測定にて, S37 の施設でデータ低値を認めた。SH2701 の HLA-C 測定では, S31 の施設でコンタミネーション様の反応を認め, S37 の施設でデータ低値を認めた。SH2701 の HLA-DQ, DP 測定では, S37 の施設でデータ低値を認めた。SH2702 の HLA-A, B 測定では, S46 の施設でコンタミネーション様の反応およびデータ低値を認めた。SH2702 の HLA-C 測定では, S46 の施設でデータ低値を認めた。SH2702 の HLA-DR 測定では, S37 の施設でデータ低値を認めた。SH2702 の HLA-DQ, DP 測定では, S37 の施設でコンタミネーション様の反応を認めた。SH2703 の HLA-DR 測定では, S37 の施設でコンタミネーション様の反応を認めた。以上よりコンタミネーション様の反応およびデータ低値を認めた施設は S31, S37 および S46 の 3 施設であった。

5) SH2702 の DQ2 抗体有無の判定について

SH2702 における DQ2 抗体有無の判定では, 17 施設で抗体あり, 14 施設で抗体なし, 3 施設で判定保留であった。

3. まとめ

LABScreen による抗体 QC 参加施設の抗体有無の一致

率は、Class I で 100%、Class II で 97% であった。Class II 測定において抗体有無の不一致を 1 施設に認めた。全体として、測定データ低値およびコンタミネーション様を認めた施設が 3 施設認められた。該当施設は検査手技等の確認をされる必要がある。コンタミネーション防止対策として、ピペットの操作方法や検査過程における洗浄操作等の確認、場合によってはフィルター付きチップ採用を検討されるのもよいかもしれない。

カットオフ設定について、各施設から提出されたカットオフ値変更欄から調査を実施した。また、QC データ報告時のカットオフ値変更欄のみでは読み取れない情報について、幾つかの QC 参加施設連絡担当者に問合せを実施した。その結果、より正確なデータ収集が可能となった。問合せ施設からの協力および親切な対応に感謝する。カットオフ設定確認の結果、6 種類のカットオフ設定がなされていた。カットオフ基準の統一は今後の課題である。

QC では同一サンプルを測定している。一概には言えないかもしれないが、PC/NC 比がある程度まとまった値となることが理想と考えられる。しかしながら、昨年度 QC 同様に実際の PC/NC 比は施設毎でその値（8～1869）に幅を認めている。施設間における測定機器間差

等も推測されるが、サンプルの前処理が施設によって様々であることも PC/NC 比がバラツキとなる要因の一つと推測される。サンプルの前処理については、目的にあった方法で実施するのが望ましい。施設毎の測定方法の違いもバラツキ要因となりうる可能性があるため、原則として試薬添付文書に従った検査方法の実施が必要である。また、施設間の測定データ一致を図るため、試薬添付文書では確認できないようなポイントとなる検査手技が確認できるような標準手順書作成や技術講習会実施等による標準化に向けた活動が必要かもしれない。

SH2702 における DQ2 抗体判定について、17 施設で抗体あり、14 施設で抗体なし、3 施設で判定保留と結果にバラツキを認めている。現行試薬において DQ2 抗体の判定に関わるピーズは複数存在する。DQ2 について同一アレル特異性 (DQB1*02:01) を有している複数ピーズでの DQA1 アレル特異性は同じではない。つまり、ある種の DQA1 アレル特異性に対する抗体の反応でも DQ2 アレル特異性 (DQB1*02:01) を有しているピーズの一部は陽性となる可能性がある。この場合の結果解釈が DQ2 抗体有無の判定のバラツキになるため、結果解釈や報告に注意が必要である。

第19回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 WAKFlow (MR・HR) 法—

平田 康司¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 中四国ブロック血液センター

1. はじめに

WAKFlow HLA 抗体検査試薬は WAKFlow MR および WAKFlow HR に大別され、HLA 抗体検出試薬である WAKFlow MR の参加施設はクラス I が 16 施設であり、クラス II は 10 施設で昨年度より各 3 施設の増加がみられた。一方、1 抗原に対する抗体の特異性が識別可能な抗体同定試薬である WAKFlow HR クラス I の参加施設は 17 施設であり、昨年度 2 施設より大幅に増加した。試薬ロットは、WAKFlow MR クラス I では R0A:4 施設、R0B:12 施設の使用であり、そのうち 10 施設が血清前処理を実施していた。WAKFlow MR クラス II では R0A:2 施設、R0B:8 施設の使用であり、そのうち 4 施設が血清前処理を実施していた。WAKFlow HR クラス I の試薬ロットは全施設が S0A を使用しており、そのうち 11 施設が血清前処理を実施していた。

2. WAKFlow MR

施設のデータ比較および解析は、血清 SH2701 ~ SH2704 の各サンプルにおいて、各施設から提出された蛍光ビーズの反応蛍光強度 (Median) データの平均値および 2SD を算出し行った〈施設の精度管理〉。また、試薬特性の解釈については、各施設の Index 値の平均を LABScreen Single Antigen (SA):BNV および WAKFlow HR (Class I):Calmed の抗原反応性と比較し行った〈試薬の反応性〉。

1) MR クラス I

①施設の精度管理:

バックグランドビーズ (BB)、陽性コントロールビーズ (PB) および HLA ビーズの反応蛍光強度が他施設と比較し低い施設 (施設番号:27S27) があつた。原因と

しては、①二次抗体濃度調整、②標識抗体の劣化、③測定機器のコンディション等が考えられる。一方、Index 値では施設間に大差は無かつた。

②試薬の反応性

抗体の有無の判断に相違を生じる反応蛍光強度および Index 値となるようなことはなかつた。カットオフ値付近において施設間差が生じる原因としては、SH2701 では A3 および A31 の弱い反応性、SH2702 では Cw 抗体の反応性、SH2703 は IgM 性抗体の反応性が要因として推察された。

2) MR クラス II

①施設の精度管理

BB、PB および HLA ビーズの反応蛍光強度で若干の施設間差はみられたが、Index 値に大差は無かつた。

②試薬の反応性

血清 SH2701 ~ SH2704 の各サンプルにおいて、概ね明瞭にカットオフ値を設定することが可能であつたが、SH2701 では DP 抗原との反応もありカットオフ値の設定に苦慮するものと推察される。

3. WAKFlow HR クラス I

WAKFlow HR クラス I は、日本人の HLA アリル頻度を考慮した試薬ビーズ構成となっているという特徴をもつ試薬である。施設のデータ比較および解析は、各施設より提出された反応蛍光強度値 (Calmed) データの平均値および 2SD を算出し行った。その結果、平均 ± 2SD より著しく外れるビーズの反応性を示す施設が数施設 (施設番号:27S04, 27S38, 27S50) あり、そのことにより偽陰性および偽陽性判定をしている反応もみられた。当該施設においては洗浄操作等の検査手技の改善を試みる必要がある。一方、WAKFlow HR および LAB-

Screen SA の両試薬に共通するアリルピーズを中心に、各ピーズの反応性について比較した。その結果、SH2701 において A*02:06, SH2703 において B*08:01, B*14:02, B*37:01, B*35:01, B*53:01, SH2704 において B*07:02, B*27:04, B*67:01 等、各血清サンプルにおいて WAKFlow HR および LABScreen SA では反応蛍光強度値に著しい乖離がみられた。

4. まとめ

WAKFlow MR クラス I およびクラス II において、一部の施設で反応蛍光強度に乖離がみられたが、抗体の有無の判断に相違を生じる反応蛍光強度および Index とな

るような施設は無かった。WAKFlow MR は血清サンプルによってはカットオフ値付近において施設間差が生じるが、同試薬は「抗体検出用」としての意味合いが強く、抗体同定には WAKFlow HR および LABScreen SA といった試薬をしている施設が多いのではないかと考えられる。WAKFlow HR クラス I において、一部の施設で偽陰性および偽陽性となるような反応結果もみられたが、これらは洗浄操作等を見直すことにより改善されるものと推察される。一方、WAKFlow HR クラス I は概ね良好な反応性を示したが、血清サンプルによっては他法と検査結果が異なる場合もあり、今後更なる検証および試薬改良等が必要であると考えられる。

第 19 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

その他検査法は、例年通り、「FlowPRA, LABScreen, WAKFlow 以外の検査法において、SH2701～SH2704 の 4 サンプルを測定した場合」と定義して解析した。参加内容は、LCT 法 (2 施設)、AHG-LCT 法 (2 施設)、FCM 法 (2 施設)、MPHA 法 (4 施設)、ELISA 法 (1 施設)、ICFA 法 (2 施設) であった。ELISA 法の Quik/B-Screen キットは、1 施設のみの参加であり、ここで特に検査法としての解析は述べない。

FCM 法の提出時スコアは、一定基準で再解析したスコアと一部異なる。各施設の判定基準が一定でないことが原因で、基準の解釈について統一性が欠如した結果といえる。一方、判定基準が定まっている ICFA 法ではそのようなことはなく、class I-2 (追加ビーズ) も確実に機能していることが確認できた。今回の抗体サンプルは MPFA 法スクリーン試薬の抗原構成で対応しきれない特異性であり、SH2701 と 2703 が陰性判定になった。HLA の抗体スクリーニング試薬としては、性能が不十分といえる。

それぞれの方法で参加施設数が少なく、反応数も不十分なことから確実な解析は困難であった。ほとんどの施設は、精製抗原ビーズ試薬を併用しており、細胞との反応が比較できること、さらに、クロスマッチに重要な方法であることから、これら検査法の必要性は高い。一方、本年から整理した検査状況シートに「未記入」が多く、効率的な解析に必要な不可欠な情報であるためぜひとも記入していただきたい。

2. クロスマッチ

クロスマッチは、27 施設の参加があり、4 施設がダイ

レクトクロスマッチのみでそれ以外の 23 施設が双方に参加した。

2-1. ダイレクトクロスマッチ

ダイレクトクロスマッチは、「LCT, FCM, ICFA などクロスマッチ可能な検査方法において、SH2701/HLA Class I を対象とし、クロスマッチ入力シートに記入されていること」と定義して解析した。LCT 法 (4 施設)、FCM 法 (6 施設)、ICFA 法 (11 施設) の参加であった。

FCM 法は一部の施設で、パネル細胞単位での不均一例と同一パネル細胞内での不均一例があり、これではグレーゾーン近辺の反応に何らかの影響を与えると思われる。提出結果と再解析結果の乖離も見受けられ、その他検査法の項目でも述べたとおり、測定及び判定基準の統一化が達成されなければこの問題は永遠に続くであろう。

ICFA 法は、class I-2 (追加ビーズ) の導入により、精製抗原ビーズ試薬の特異性と整合した結果に近づいた。興味深いことに、両ビーズの反応パターンの違いが、抗体の性状の違いをより明確に表し、ひとつの抗体に複数の要素が織り込まれていることが良く判る結果となった。

本 QCWS のダイレクトクロスマッチは、各施設の細胞が不特定のため確実な解析が困難である。この項目は、全血クロスマッチ (移植学会連携) に移行させ、方法論は Cell Base で行う「その他の抗体検査方法」で実施 (抗体 4 サンプル対象) することが望ましいと思われる。その際、各施設が LCT 法、FCM 法、ICFA 法などを同一パネル細胞で実施できることが理想と考える。これにより、Cell Base Assay の技術水準が向上し、方法間での抗体検出状況も把握できる。さらにその技術はクロスマッチで生かすことが可能となる。

2-2. 仮想クロスマッチ

仮想クロスマッチは、抗体サンプル (SH2701) と 2 本の DNA サンプル (H2703, H2704) を対象に実施した。

H2703 は、タイピング結果の表記の問題で、「反応が予測される抗体特異性」に本来存在しない反応を記入せざるを得ない事態となった。具体的には、抗体特異性が A25+A26+ に対し、タイピング結果が Ambiguity に対応した表記で A25, A26 となったため、この反応は本来 A26 の抗原抗体反応であるところ、A25 の反応も記入せざるを得なかったからである。また、血清処理の影響 (H2703 の A24, Cw1, H2704 の Cw12), 抗体検査試薬の不具合 (H2704 の A2) が仮想クロスマッチ判定を誤らせた例があった。さらに、抗体サンプル SH2701 本人

の HLA 型と同一の抗原に反応 (H2704 の B35) が認められた例があり、抗体検査手技に何らかの問題があると考えられる。

このように、仮想クロスマッチに参加する利点は、単に業務上の必要性ばかりではなく、抗体検査における特異性判定や DNA タイピングの表記の理解を深めることに役立つと思われる。本 QCWS で実施する仮想クロスマッチは疑似クロスマッチではあるが、抗体検査やタイピング検査の多くが適合判定するためのデータ提供を目的とするならば、それらの結果を検証する一つの手段になりうるといえる。仮想クロスマッチに関係ない施設でも、トレーニングの場として参加する意義はあるのではなかろうか。

第 19 回 HLA-QC ワークショップレポート —移植学会連携 全血クロス—

橋口 裕樹^{1,2)}

¹⁾ 福岡赤十字病院 検査部移植検査課 / 輸血細胞治療部

²⁾ 日本移植学会 移植関連検査委員会 委員

1. 概要

平成 25 年 4 月より日本組織適合性学会と日本移植学会が連携し、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）の精度管理を試行的に実施する事となり、今回 3 回目の実施となった。

2. 経過

今回より QCWS 参加申し込みは、日本組織適合性学会 QCWS 参加申込書から可能となり、40 施設の参加があった。施設内訳は、臓器移植ネットワークの検査施設が 26 施設、移植関連病院が 8 施設、検査センター 4 施設、血液センター 1 施設、試薬メーカー 1 施設であった。日本移植学会移植関連検査委員会で採血した全血の発送は、日本組織適合性学会が平成 27 年 4 月に QCWS 試料を配布するのに合わせ、血清配布の翌々週に全血を参加施設に配布した。ACD-A 液入全血の発送には、東京より宅配便（常温）で発送、全国の参加施設には翌日、翌々日には到着した。一部の施設で細胞生存率が低下していたが、大きな影響は無かった。到着後、各施設において直ちに T 細胞を分離しクロスマッチを実施した。8 月後半に集計結果を各施設にメールで送信、9 月に開催された第 19 回 QCWS（茨城県水戸市）、10 月に開催された第 51 回日本移植学会総会（熊本県熊本市）にて報告を行った。尚、28 年 3 月に開催される第 49 回日本臨床腎移植学会（鳥取県米子市）でも報告予定である。

3. 試料選択および検査方法

ドナー全血は、日本移植学会移植関連検査委員会で採血した ACD 採血 7.5 ml (ICFA 参加施設には EDTA-2K, 1.5

ml を追加) を準備した。ドナー HLA タイプは、日本人に高頻度に発現しているものを選択した。血清は、QCWS 部会で準備された SH2703, SH2704 を選択した。SH2703 はドナー HLA 抗原に対する HLA 抗体を保有していない陰性検体として、SH2704 はドナー特異的抗体 Donor Specific Antibody ; DSA を保有する陽性検体と想定して選択した。

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。方法別にみると、フローサイトクロスマッチ Flow Cytometry Cross match ; FCXM 法が 29 施設と最も多く、参加施設の 73% で検査、次いでリンパ球細胞傷害試験 Complement dependent cytotoxicity ; CDC 法が 24 施設、Immunocomplex capture fluorescence analysis ; ICFA 法が 15 施設、AHG-CDC 法は 7 施設であった。検査法も 2/3 の施設では複数法を組み合わせる実施されており、中でも一番多い組み合わせは、FCXM 法 + CDC 法であった。

4. 結果

SH2703, SH2704 ともに 80% を超える高い一致率であったが、一部の施設においては結果の誤入力と思われるものがあつた。各方法の一致率は、学会ホームページを参照して頂きたい。併せて各施設にアンケートをお願いし検査条件、試薬、判定基準を調査し各施設にメールにて報告した。昨年と同様に施設において検査方法、判定基準は様々であった。尚、配布された血清は、OneLambda LABScreen Single Antigen にて抗体特異性、MFI 値が明らかになっているので、自施設でのクロスマッチ検査の検証等に使用頂けたらと考える。

5. まとめ

今回、第3回全血クロスマッチを全国40施設参加のもと実施された。QC参加申し込みも組織適合性学会の配慮によりQCWSと同時に行えるようになり、手続き

も簡素化された。3回の精度管理を終え、環境が構築され継続して行える体制が整ってきた。今後は、問題点として残っている検査方法の標準化、判定基準などを両学会で連携をとりながら、全血を用いたクロスマッチの精度管理を推進していきたいと考える。