

第12回 HLA-QC ワークショップレポート

第12回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過—

木村彰方（東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野），
日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会 #

#: 日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会構成員：木村彰方^{1,2)}，赤座達也¹⁰⁾，太田正穂³⁾，柏瀬貢一⁴⁾，小林賢⁵⁾，酒巻建夫⁶⁾，佐田正晴⁷⁾，田中秀則⁴⁾，中島文明⁸⁾，成瀬妙子⁹⁾，丸屋悦子¹⁰⁾，安波道郎^{2,11)}（所属：¹⁾東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野，²⁾東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部ゲノム多様性研究室，³⁾信州大学医学部法医学，⁴⁾東京都赤十字血液センター検査部，⁵⁾日本薬科大学生物科学部，⁶⁾国立病院機構千葉東病院 HLA 検査室，⁷⁾国立循環器病センター研究所，⁸⁾神奈川県赤十字血液センター検査部，⁹⁾東海大学医学部分子生命科学系，¹⁰⁾特定非営利活動法人 HLA 研究所，¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学)

1. ワークショップ集会までの経過 (表 1)

認定制度委員会が主催する HLA-QC ワークショップ (QCWS) は、今回で通算 10 回 (大会長主催を含めると通算 12 回) となった。平成 19 年 9 月に QCWS 部会において今年度の QCWS の大まかな方針が討議されたが、学会に設置した研究倫理審査委員会による検討と承認を受けた運営方法に従って、DNA タイピング QC (DNA-QC) と抗体を用いた QC (抗体 QC) を実施している。平成 19 年 11 月に MHC 誌上と学会ホームページ上に QCWS 案内が出され、平成 20 年 3 月の締め切りまでに 165 名 (64 施設) から参加申し込みがあった。参加申し込み、参加者との連絡のいずれについても原則としてインターネットを利用 (HP からの申し込み、電子メール連絡) することとして運営した。参加者数が確定した 4 月に QCWS 部会を開催し、昨年度のアンケート結果を参考にして具体的なサンプルの選定、QCWS のテーマの決定と電子媒体を用いたデータ収集の方法を決定した。ついで、4 月上旬から中旬にかけて、同意書・誓約書を得た後に施設を単位としてサンプルを発送

した。5 月上旬にデータ入力フォーマットを送付し、6 月上旬のデータ送付締め切りまでに 63 施設からデータが回収された。それらの生データはとりまとめた上で各解析担当者に送付され、8 月下旬まで解析された。前回と同様に、解析結果を参加者に直接配布するのではなく、QCWS 部会の HP 上に解析が終了した項目ごとに順次掲載し、参加者が必要に応じてダウンロード出来る形式とした。

2. QCWS のテーマ

組織適合性技術者認定制度の主旨にそった QCWS のテーマを設定することとして、今回の QCWS のテーマを QCWS 部会で検討した結果、DNA-QC 部門は、(1) 日常的に遭遇しない珍しいタイプ、(2) ろ紙サンプル、(3) 全ゲノム増幅 (WGA) サンプル、(4) タイピング精度 (再現性) の検討をテーマとし、抗体 QC 部門は、(1) 日本人に存在しない抗原に対する日本人由来単一特異性抗体 (non-HLA 抗体)、(2) 測定時のバックグラウンドが高値を示す抗体と対策、(3) 高感度法でも微弱な反応性の抗体、(4) 前回

表 1 第 12 回 QCWS の実施経過

平成 19 年 9 月	QCWS 部会において第 1 2 回 QCWS の方針決定 DNA-QC 部門; 1) 日常的に遭遇しないタイプ (主に A, B 座)、2) ろ紙付着細胞サンプル、3) 全ゲノム増幅サンプル、4) タイピング精度 (再現性) 抗体 QC 部門; 1) 明確な抗体特異性を有する IgM 抗体、2) 明確な抗体特異性を有する IgG 抗体、3) 広範囲に抗体特異性を有するサンプル、4) C ローカス抗原に対する抗体、5) HLA クラス II 抗原に対する抗体
平成 19 年 11 月	第 1 2 回 QCWS 案内の作成、 「MHC」および HP への掲載
平成 20 年 3 月	参加申し込み; 64 施設 (165 名) DNA-QC 参加: 57 施設、抗体 QC 参加: 35 施設
平成 20 年 3 月-4 月	QCWS 部会内各部門において具体的なサンプルの決定: QCWS 部会にて解析担当者の決定、QCWS 集会の方針決定
平成 20 年 4 月上旬-中旬	同意・誓約書を取得した上で、QCWS サンプルの配布
平成 20 年 5 月上旬	データ入力フォーマット送付
平成 20 年 6 月上旬	データ回収締め切り
平成 20 年 6 月-8 月	解析担当者によるデータ解析
平成 20 年 8 月中旬-下旬	QCWS 部会 HP に解析結果の掲載

表 2 QCWS サンプル (DNA 部門) の形態と容量

サンプル ID	形態	容量
H2001	ゲノム DNA 溶液	4ug (80ul)
H2002	ゲノム DNA 溶液	4ug (80ul)
H2003	ゲノム DNA 溶液	4ug (80ul)
H2004	WGA DNA 溶液	1ug (20ul)
H2005	ろ紙付着細胞	3x10 ⁵ 細胞
H2006	ろ紙付着細胞	3x10 ⁵ 細胞

表 3 QCWS サンプル (抗体部門) の特異性

サンプル ID	抗体特異性	抗体性状	コメント
SH2001	B15+B5, DR9	HLA クラス I/II-IgG	
SH2002	B44+B45+B76	HLA-クラス I-IgM	抗体力価 (LCT 法) ×4 ↑
SH2003	Non-HLA, MICA19	MICA-IgG	HLA(-), high background LABScreen BNV=4,000 ↑
SH2004	DR7	HLA クラス II-IgG	LCT 法(-) LABScreen BNV=1,500 前後
SH2005	B15	HLA クラス I-IgG	
SH2006	A locus multi, DR52	HLA クラス I/II-IgG, IgM?	24homo(-) 抗体力価 (LCT 法) ×32 ↑

提出したサンプル, (5) エピトープ解析, (6) 許容抗原解析の検討をテーマとした。用いたサンプルは表 2 (DNA 部門) および表 3 (抗体部門) に示すとおりであった。なお, 今年度のデータ解析においては, QCWS 部会メンバー以外に広く参加を求めるとした。

3. 参加者・参加施設

参加者は総数 208 名 (QCWS 試料配布は 61 施設) であった。なお, 移植学会と同時開催であったためと考えられるが, QCWS 集会のみの当日参加が 43 名あり, 臨床移植医の関心の高さが窺えた。

参加施設名: 徳島大学病院・輸血部, 三菱化学メディアエンス遺伝子検査部, (株)エスアールエル・遺伝子検査課, 福岡大学医学部・腎臓・膠原病内科, (株)ビー・エム・エル特殊分析部 特殊技術課, 北海道大学病院検査・輸血部, 関西医科大学附属病院 輸血部, 福島県立医科大学 輸血・移植免疫部, 北海道赤十字血液センター検査部検査三課, 富山大学付属病院, 特定非営利活動法人 HLA 研究所, (株)ベリタス, (株)リプロセル, 大阪市立大学医学部附属病院・輸血部, 岡山県赤十字血液センター・検査課, 大阪府立急性期・総合医療センター組織適合性検査室, 佐賀県立病院好生館・検査科, 日本赤十字社・中央血液研究所, 千葉県赤十字血液センター検査二課, 東京都赤十字血液センター・検査部検査三課, 広島県赤十字血液センター検査課, 国立循環器病センター 臨床検査部, 静岡県立総合病院・血液管理室, 札幌北楡病院・臨床検査課, 宮城県赤十字血液センター検査課, 東海大学医学部附属病院・細胞移植再生医療科, 日本赤十字社九州血液センター検査二課, 大分県立病院 臨床検査技術部, 湧永製薬(株)バイオ開発事業部, 愛知県赤十字血液センター検査二課, 名古屋第二赤十字病院・HLA, 岐阜大学病院 検査部, 大阪府赤十字血液センター・検査二課, 千葉東病院 HLA 検査室, 東京女子医大腎センター移植免疫, 虎ノ門病院 輸血部, Conexio Genomics Pty Ltd, 仙台社会保険病院・検査部, 横浜市立大学附属病院輸血部, 三重県赤十字血液センター 学術, 高知医療センター MCM ラボ, 香川県立中央病院・中央検査部, 信州大学医学部法医学教室, 熊本県赤十

字血液センター・技術課, 財団法人鷹揚郷腎研究所 弘前病院・HLA 検査室, 立川総合病院・臨床検査科, 東海大学医学部教育研究支援センター, 自治医科大学 輸血・細胞移植部, 保険科学研究所 特殊分析センター, 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学, 新潟市民病院 輸血室, 北里大学病院・臨床検査部, 金沢医科大学病院 (北陸腎移植 HLA 検査センター), 岩手医科大学付属病院・中央臨床検査部, 京都大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部, 山形県立中央病院・輸血部, 福岡赤十字病院・検査部, (株)医学生物研究所・応用技術部, 広島大学病院・輸血部, 岐阜赤十字病院 検査課, 国立病院機構長崎医療センター, 広島県赤十字血液センター 製剤課, 国立国際医療センター検査部, 東京医科歯科大学難治疾患研究所 (以上のべ 66 施設)

4. 解析担当者

今年度のデータ解析担当者(所属)と分担項目は以下の通りである。

(1) DNA-QC

1. 平田康司 (岡山県赤十字血液センター): 総合判定
2. 酒巻建夫 (千葉東病院): SSO 法
3. 丸屋悦子 (HLA 研究所): ルミネックス法
4. 石井博之 (大阪府赤十字血液センター): SSP 法および RFLP 法
5. 石井博之 (大阪府赤十字血液センター): SBT 法
6. 安波道郎 (長崎大学熱帯医学研究所): WGA 法
7. 田中秀則 (日赤中央血液研究所): 表記法およびハプロタイプ解析

(2) 抗体 QC

1. 中島文明 (日赤中央血液研究所): 総合解析
2. 寺木佳子 (東京都赤十字血液センター): LCT・AHG-LCT
3. 佐藤一弘 (宮城県赤十字血液センター): MPHA・PAKPLUS・LAT
4. 宮崎孔 (北海道赤十字血液センター): LIFT
5. 田中秀則 (日赤中央血液研究所): WAKFlow
6. 佐藤壯 (札幌北楡病院): FlowPRA

7 高陽淑 (大阪府赤十字血液センター): LAB-Screen

5. まとめ

QCWS は組織適合技術者認定制度委員会が主催したため、昨年度までと同様、認定制度の主旨にそった試料の構成や選択を行い、QCWS 集会の前に試料の構成を公表し、参加者自身がQCWS 集会までに結果を自身で検討できるようにした。また、あらかじめ生データ資料をCDRで送付することによって、参加者が全体の解析も自身で可能とした。昨年度に立

ちあげたQCWS 部会のホームページに解析結果を掲載することでQCWSに参加していないでも全体の解析結果を閲覧可能とした。HLA タイピング技術を向上させる上では、いかなるサンプルをどのようにタイピングするかなど、種々異なる条件を考慮してタイピング方法を選択し、タイピング結果を評価することが必要である。

今年度をもって認定制度委員会が主催するQCWSは10回を数えたため、これを一区切りとし、次年度からはQCWS 部会メンバーを一新すると共に、新しい枠組みでQCWSに取り組むこととする。

第12回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —クラス I およびクラス II 総合判定データ解析—

平田康司 (岡山県赤十字血液センター検査課)

1. はじめに

昨年同様、今年度も総合判定データ解析をクラス I およびクラス II を一つにまとめて行い、検査報告数の多かった A, B, Cw および DRB1 の正解率を中心として検討を行った。なお、各施設より提出された総合判定にコンセンサス アリル (2桁レベルおよび4桁レベル) と同様の表記が含まれるものを正解とし、正解率を算出した。

なお、参加施設、DNA ソースの情報等は他の稿を参考願いたい。

2. 検討方法

以下の項目について解析を行った。

2.1 検査方法・方法数およびローカス別の検査結果報告施設数

2.2 検査方法・方法数および検査ローカス項目の検査結果報告施設数

2.3 ローカス別の正解率

3. 結果および考察

3.1 検査方法・方法数およびローカス別の検査結果報告施設数

表1に検査方法・方法数およびローカス別の検査結果報告施設数を示した。データを提出した57施設の内、SSO法を使用している施設が最も多く、次いでSSP法が多く使用されていた。SBT法およびRFLP法を用いている施設数はほぼ昨年と同様であった。本年はSSCP法を用いた施設はなかった。使用されている検査方法の比率もほぼ昨年と同様であった。また、ローカス別ではAローカス57施設、Bローカス57施設、Cwローカス36施設、DRB156施設の報告であった。A, B, Cw および DRB1 のいずれにおいても1法のみで検査結果を報告した施設が最も多く、2法の方法を用いた施設では、SSO法とSSP法もしくはSSOとSBT法の組合せで検査を行った施設が多かった。この傾向もほぼ昨年と同様であった。

表5 Cw ロークラス・正解率

	QC ID	HLA型	DNA型	Low			High/Middle		
				報告数	正解数	正解率	報告数	正解数	正解率
Cw	H2001	(Cw7) (-)	Cw*0702 (Ambiguity: Cw*0750(EX2,3)) -	34	34	100.0%	32	30	93.8%
	H2002	(Cw4) (Cw8)	Cw*0401 (Ambiguity: ※2 (EX2,3)) Cw*0801 (Ambiguity: ※2 (EX2,3))	35	35	100.0%	34	33	97.1%
	H2003	(Cw9) (Cw12)	Cw*0303 (Ambiguity: Cw*0320(EX2,3)) Cw*1202	35	34	97.1%	34	34	100.0%
	H2004	(Cw4) (Cw8)	Cw*0401 (Ambiguity: ※2 (EX2,3)) Cw*0801 (Ambiguity: ※2 (EX2,3))	32	32	100.0%	31	31	100.0%
	H2005	(Cw7) (Cw14)	Cw*0702 (Ambiguity: ※3 (EX2,3)) Cw*1402 (Ambiguity: ※3 (EX2,3))	25	23	92.0%	22	21	95.5%
	H2006	(Cw4) (Cw8)	Cw*0401 (Ambiguity: ※2 (EX2,3)) Cw*0801 (Ambiguity: ※2 (EX2,3))	25	25	100.0%	23	23	100.0%
	平均						98.2%		

※2: Cw*0409/28/30, Cw*0801 Cw*0429, Cw*0810
 ※3: Cw*0750, Cw*1402 Cw*0737, Cw*1406

表6 DRB1 ロークラス・正解率

	QC ID	HLA型	DNA型	Low			High/Middle		
				報告数	正解数	正解率	報告数	正解数	正解率
DR	H2001	DR1	DRB1*0101 -	56	54	96.4%	52	52	100.0%
	H2002	DR4 DR9	DRB1*0406 (Ambiguity: ※4) DRB1*0901 (Ambiguity: ※4)	56	55	98.2%	53	51	96.2%
	H2003	DR4 DR9	DRB1*0405 DRB1*0901	56	56	100.0%	54	53	98.1%
	H2004	DR4 DR9	DRB1*0406 (Ambiguity: ※4) DRB1*0901 (Ambiguity: ※4)	55	54	98.2%	52	52	100.0%
	H2005	DR8 DR14	DRB1*0802 (Ambiguity: ※5) DRB1*1406 (Ambiguity: ※5)	44	41	93.2%	35	31	88.5%
	H2006	DR4 DR9	DRB1*0406 (Ambiguity: ※4) DRB1*0901 (Ambiguity: ※4)	47	46	97.9%	45	45	100.0%
	平均						97.3%		

※4: DRB1*0420, DRB1*0906 (SSCP, RCGA 区別可能?)
 ※5: DRB1*1347, DRB1*1452 (SSCP, RCGA 区別可能?)

3.2 検査方法・方法数および検査ロークラス項目の検査結果報告施設数

表2に検査方法・方法数および検査ロークラス項目の検査結果報告施設数を示した。A, B, DRB1の組合せにCw, DQB1およびDRB3/4/5をそれぞれ組合せた施設が多く、ルーチン検査で必要とされているロークラスの組合せ(あるいは試薬)の選択がなされている傾向があらわれているようである。あるいは、Cw, DQB1およびDRB3/4/5のデータ情報をもとにハプロタイプを推定し、A, B, DRB1の検査結果を確認しているとも考えられる。

3.3 ロークラス別の正解率

表3, 表4, 表5および表6にA, B, Cwおよび

DRB1の各ロークラス別の正解率を示した。すべてのロークラスにおいてほぼ90%以上の正解率を示したが、H2003のB*1528のアサインミスが多い結果となった(正解率: 77.8%)。この結果は特定の試薬(施設)において多い傾向がみられた。また、H2005においてはDRB1*1406のアサインミスがみられた。一方、PCR増幅不良によるものと思われるアサインミスおよび記入ミスも散見された。

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

第12回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —SSO 法—

酒巻建夫 (千葉東病院 HLA 検査室)

1. SSO 法参加施設

QCWS DNA 部門でエントリー 58 施設中で 57 施設が解答を寄せた。SSO 法のうちワクナガの MPH-2 キットでの参加は 2 施設 (3.5%) であった。ダイナル社リライキットを使用した施設は A 座と B 座 19 施設 (33.3%), C 座は 4 施設 (7%), DR 座は 19 施設 (33.3%), DQ 座は 2 施設 (3.5%) であった。参加した 19 施設すべてが臓器移植ネットワークのタイピングを担当する施設であった。DNA 溶液検体, WGA 検体, ろ紙検体にも対応していた。参加施設が少なかったため MPH-2 とリライキットの DQB1 生データ解析は省略した。

2. 報告書の記入について

方法別に判定アレルを記入していない施設, 4 桁ではなく 6 桁で記入していた施設, アレルを表す '*' が記入されていなかった施設, Null アレル場合には N を省いて記載するところを記入した施設, DRB3-4 アレル記入をしていない施設などが認められた。該当施設は D002, D006, D024, D030, D032, D047 であった。アレル判定が他の施設と異なるものと生データスコアが他の施設と異なるものと合わせ, 注意を喚起する目的で集計データセル背景を黄色にして表示した。

また今回のサンプルの中には B15 関連抗原があり, B*9507, B*9509 などが候補に含まれ, B 座の結果記入に際し 4 桁 / 2 桁 / 4 桁表記など解決されていない問題が生じた。

3. キットの使用状況

A 座では 48 プローブキットを使用した施設が 15, 43 プローブキットを使用したのは 4 施設であった。

43 プローブキットの生データは 48 プローブの位置に並び替えて表示した。

B 座についてはすべての施設が 61 プローブキットを使用していた。

C 座については 37 プローブキットを使用していた。

DR 座については 18 施設が DRB キット (DRB1, DRB3-5) を使用し 1 施設が DRB1 キットを使用した。DRB キットは 54 プローブ構成であり, DRB1 キットは 60 プローブ構成になっていて, プローブ設定部位が大幅に異なっているため同じ集計表には入れないで別扱いにした。H2005 検体に対し 3 施設が追加的に DR3,11,13,14 プライマーを用いてプローブ発色を実施していた。

施設間で使用ロットが共通のものや異なるものが認められたがロット間による差異は認められなかった。

4. 生データスコア

A 座の生データスコアではほぼ全施設で一致していた。もっとも施設間でばらついたのはポジティブコントロールプローブ # 21 と # 47 であった。

集計結果から A 座 # 4 プローブには問題のあることが判明した。このプローブは A*0201/07 では陽性に, A*0206 や A*2402 では陰性に出る重要なプローブである。スコア 1, 2 を陰性, スコア 4 以上を陽性として集計すると明らかに偽陽性が出やすいことがわかった。

H2001 は A*2402 のホモザイゴウトであり陰性になるところであるが, 3 施設で偽陽性が出ていた。H2002, H2004 でも偽陽性が出ていた。このことから # 4 プローブが偽陽性になりやすいプローブと考

表1 A座プローブ#4の反応性

サンプル	++	+ -	- +	--	N
H2001	0	0	3	16	19
H2002	0	0	2	17	19
H2003	19	0	0	0	19
H2004	0	0	2	17	19
H2005	15	1	0	0	16
H2006	0	0	0	18	18

えられる。

B座については生データスコアは#29, #60のコントロールプローブを除くとほぼ全施設が一致していた。

C座については4施設が解答を寄せた。生データと判定が概ね一致していた。1施設では判定結果の記載があったが生データスコアの記入が漏れていた。

DRBキットでは生データスコアはほぼ一致していた。しかしその中で#30プローブの反応性に問題があると考えられた。DRB1*0101 (H2001) や DRB1*1402/06 (H2005) の場合には強く陽性に反応するが、

DRB1*0405/10 (H2003) の場合には本来陽性に出るものが弱く陽性反応でもスコア4-8とばらついていた。H2003検体では2施設が陰性と判定したためにDRB1*0411と誤ったタイピングとなった。このことはDR4遺伝子のPCR反応が十分ではない可能性より十分なPCR産物があるにもかかわらずアッセイ反応液中でのPCR産物の立体構造がプローブとの反応を弱くしている可能性を考慮した方がよいかもしれない。いずれにしてもDR4が関係する場合(#4プローブと#42プローブが陽性)には#30プローブの判定には十分に注意を払う必要がある。

第12回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —ルミネックス法—

丸屋悦子 (特定非営利活動法人 HLA 研究所)

1. はじめに

今回のリポートは前年度との比較を中心にまとめる。ワークショップ参加者(施設)が1年間の技術の向上とその持続を評価するための参考資料と、typing kitの継続的な品質の評価の参考資料になることを目的とする。

評価方法: 昨年と同様。

QC用検体: 昨年と検体は異なるが、コンセプトは

同様。

2. 参加施設と使用 typing kit について

Luminex法を用いる施設の増加(3割程度)。typing kitは昨年度最優秀kitの使用が増加。

3. 施設別評価

HLA-class I: Table 1-1にHLA class Iの全参加

施設の成績を示す。最優秀 Lab: D005, D046, D049
HLA-A locus

PCR 精度: ■キットを使用した施設で極端な施設間差があった。総合的に判断すると, exon 2,3 の増幅効率にアンバランスが起き易いキットと考えられる。

Typing Technique: 施設別に極端なバラツキはなかった。PCR 精度は極端に悪いが, Typing Technique は最高得点であった2施設が特徴的であった。

HLA-B locus

PCR 精度: ■キットで A locus と同じ特徴を示した。

Typing Technique: 施設別に極端なバラツキはなかった。

HLA-C locus

PCR 精度: 使用キットによる特別な傾向はない。

Typing Technique: 施設別に極端なバラツキはなかった。

HLA-class II: Table 1-2 に HLA class II の全参加

施設の成績を示す。最優秀 Lab: D045, D046, D058
HLA-DR locus

PCR 精度: ■キットを使用した施設はすべて満点であった。

Typing Technique: ■キットを使用した施設を比較すると, 施設間差がみられ, 技術的な改良の余りがみられた。その他のキットを使用した施設は PCR 精度と Typing Technique の評価はほぼ相関していた。

HLA-DQ and DP locus

参加数は少ないが, 施設・キット共に優秀な成績であった。

総合評価: Table1-3 に本年度の Luminex による HLA typing の総合評価を示す。最優秀 Lab: D046

4. キット別評価

Table 2 に参加施設により使用された3種のキットについて, template の種類別の総合評価を示す。HLA-class I で, 最優秀は▲, class II で■, 総合で

Table 1. Luminex 法による HLA-class I and II typing, 施設別成績

Table 1-1. HLA-class I

施設ID	kit	HLA-A			HLA-B			HLA-Cw			Class I			評価(PCR 精度1)	評価(PCR 精度2)
		P/N	PCR精度1	PCR精度2	P/N	PCR精度1	PCR精度2	P/N	PCR精度1	PCR精度2	P/N	PCR精度1	PCR精度2		
D005	●	3.8	5.0	4.8	4.2	5.0	4.2				4.0	5.0	4.5	8.2	8.2
	▲	3.1	4.0		3.4	4.3		3.6	3.7		3.3	4.0			
D046	●	3.9	5.0	4.5	4.1	5.0	3.7	3.1	3.7	4.3	3.7	4.6	4.2	8.2	7.8
D049	●	3.3	4.7	4.7	3.7	4.7	4.0				3.5	4.7	4.3	8.2	7.8
D016	●	3.6	5.0	4.8	4.1	4.7	3.0	3.3	3.3	4.7	3.7	4.3	4.2	8.0	7.8
D020	●	3.6	5.0	4.8	4.1	4.7	4.2	3.7	2.7	4.2	3.8	4.1	4.4	7.9	8.2
D007	●	2.8	5.0	4.5	3.7	5.0	3.8	3.8	3.0	4.3	3.4	4.3	4.2	7.8	7.6
D013	●	3.7	5.0	4.8	3.9	4.3	4.2	3.1	3.0	2.7	3.5	4.1	3.9	7.7	7.4
	▲	3.3	5.0		3.6	4.3		3.4	3.7		3.4	4.3			
D025	■	3.3	4.3		3.5	4.7		3.1	4.3		3.3	4.4	3.8	7.7	
D041	●	3.8	4.3	4.8	3.7	4.7	3.8	4.0	2.7	2.8	3.8	3.9	3.8	7.7	7.7
D045	■	4.2	2.2		3.9	3.5		4.3	5.0		4.1	3.6		7.7	
D050	▲	3.3	4.7		3.4	4.3		3.3	3.7		3.3	4.2		7.6	
D055	▲	3.1	4.7		3.2	4.3		3.5	4.0		3.2	4.3		7.6	
D054	▲	2.7	4.7		2.9	4.7					2.8	4.7		7.5	
D042	●	3.3	4.7	4.2	4.1	4.0	4.0	3.8	2.3	3.5	3.7	3.7	3.9	7.4	7.6
D023	●	3.1	5.0	4.7	3.6	4.7	3.8	3.3	2.0	3.0	3.4	3.9	3.8	7.2	7.2
D052	■	4.3	1.0		3.8	4.0		3.4	5.0		3.9	3.3		7.2	
D039	▲	2.7	4.0		3.0	3.3		3.0	4.0		2.9	3.8		6.7	
D022	■	3.9	1.3		3.6	2.7		3.3	4.7		3.6	2.9		6.5	
D044	■	4.1	2.0		3.8	3.0					4.0	2.5		6.5	
D058	■	3.9	2.7		3.3	2.3					3.6	2.5		6.1	
D035	■	3.9	1.5		3.7	2.3		3.5	2.7		3.7	2.2		5.9	
D051	■	3.5	1.3		3.2	2.0		3.4	4.0		3.4	2.4		5.8	
D048	■	3.1	2.3		3.4	2.0					3.3	2.2		5.4	
avg		3.5	3.8	4.7	3.6	3.9	3.9	3.5	3.5	3.7	3.5	3.8	4.1	7.2	7.7

Table 1-2. HLA-class II

施設ID	kit	HLA-DRB1		HLA-DQB1		HLA-DPB1		Class II		
		P/N	PCR精度	P/N	PCR精度	P/N	PCR精度	P/N	PCR精度	評価
D045	■	4.1	5.0	4.2	5.0	3.8	5.0	4.0	5.0	9.0
D046	●	4.6	5.0	4.0	4.8	5.0	3.6	4.5	4.5	9.0
D058	■	4.0	5.0					4.0	5.0	9.0
D035	■	3.8	5.0	4.2	4.8	3.9	5.0	4.0	4.9	8.9
D041	●	4.6	4.3					4.6	4.3	8.9
D051	■	3.6	5.0	4.0	5.0			3.8	5.0	8.8
D022	■	3.4	5.0	4.1	5.0			3.7	5.0	8.7
D052	■	3.5	5.0	3.7	5.0			3.6	5.0	8.6
D049	●	4.3	4.0					4.3	4.0	8.3
D016	●	3.7	4.0	4.0	4.8	4.3	3.7	4.0	4.2	8.2
D048	■	3.2	5.0					3.2	5.0	8.2
D007	●	3.9	4.0					3.9	4.0	7.9
D025	■	2.9	5.0					2.9	5.0	7.9
D044	■	2.9	5.0					2.9	5.0	7.9
D055	▲	3.2	4.7					3.2	4.7	7.9
	●	3.6	3.0					3.6	3.0	
D005	▲	3.5	5.0					3.5	5.0	7.6
								3.6	4.0	
	●	3.5	2.7					3.5	2.7	
D013	▲	3.8	5.0					3.8	5.0	7.5
								3.6	3.8	
D023	●	3.1	4.0					3.1	4.0	7.1
D020	●	3.8	2.7					3.8	2.7	6.4
D042	●	3.4	3.0					3.4	3.0	6.4
D039	▲	3.0	2.7					3.0	2.7	5.6
D054	▲	3.3	2.3					3.3	2.3	5.6
D050	▲	3.2	2.3					3.2	2.3	5.5
avg		3.6	4.1	4.0	4.9	4.3	4.3	3.6	4.1	7.8

Table-1-3. 総合評価

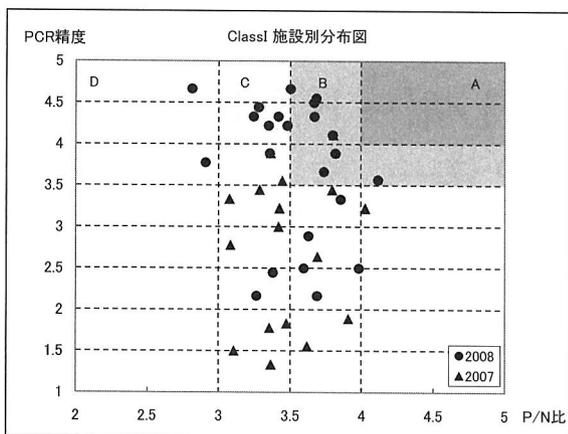
施設ID	kit	総合評価	
		PCR精度1	PCR精度2
D046	●	17.2	16.8
D045	■	16.7	
D041	●	16.6	16.5
D049	●	16.4	16.1
D016	●	16.2	16.0
D052	■	15.8	
D005	●▲	15.7	15.7
D007	●	15.6	15.5
D025	■	15.6	
D055	▲	15.5	
D022	■	15.3	
D013	●▲	15.2	14.8
D058	■	15.1	
D035	■	14.8	
D051	■	14.6	
D023	●	14.4	14.3
D044	■	14.4	
D020	●	14.3	14.6
D042	●	13.8	14.0
D048	■	13.7	
D050	▲	13.1	
D054	▲	13.1	
D039	▲	12.3	
avg		15.0	15.5

Table 2. Luminex 法による HLA-class I and II typing, キット別成績

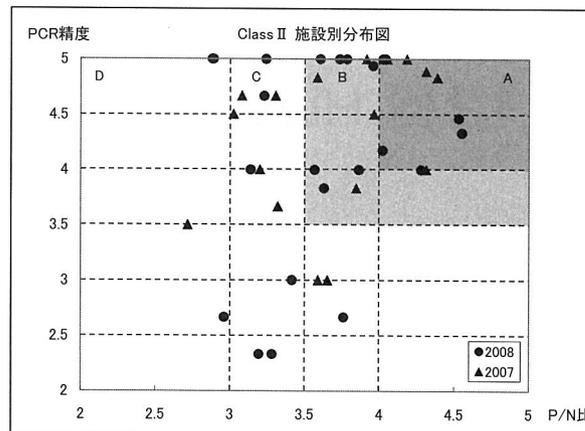
kit	template	A					B					Cw				Class I			評価		
		P/N比	PCR精度1	PCR精度2	評価		P/N比	PCR精度1	PCR精度2	評価		P/N比	PCR精度1	PCR精度2	評価						
●	total	2.1	4.9	4.7	7.0	6.8	2.8	4.7	3.9	7.4	6.6	2.1	2.8	3.7	4.9	5.8	2.3	4.1	4.1	6.5	6.4
	DNA	2.4	4.9	4.7	7.3	7.1	3.0	4.8	4.1	7.8	7.2	2.3	3.2	4.1	5.5	6.4	2.6	4.3	4.3	6.9	6.9
	filter	2.3	4.8	4.7	7.1	6.9	2.4	4.4	3.4	6.8	5.8	2.6	2.6	3.4	5.2	6.0	2.4	3.9	3.8	6.4	6.2
■	total	2.8	2.1		4.9		2.6	2.9		5.5		2.5	4.3		6.8		2.6	3.1		5.7	
	DNA	3.1	2.1		5.2		2.7	3.2		5.9		2.9	4.1		7.0		2.9	3.1		6.0	
	filter	3.0	1.8		4.8		2.9	2.1		5.0		2.8	3.7		6.5		2.9	2.5		5.4	
▲	total	2.4	4.5		6.9		2.6	4.2		6.8		2.7	3.8		6.5		2.6	4.2		6.8	
	DNA	2.6	4.7		7.3		2.9	4.3		7.2		2.7	3.7		6.4		2.7	4.2		7.0	
	filter	2.3	4.4		6.7		2.7	4.1		6.8		3.0	3.8		6.8		2.7	4.1		6.8	

kit	template	DRB1			DQB1		DPB1		Class II		評価
		P/N比	PCR精度	評価	P/N比	PCR精度	P/N比	PCR精度	P/N比	PCR精度	
●	total	2.3	3.7	6.0	4.6	4.0	3.4	4.7	3.4	4.1	7.5
	DNA	3.0	3.4	6.4	4.8	3.5	4.0	5.0	4.0	4.0	7.9
	filter	2.4	2.9	5.3	4.8	4.0	4.0	4.0	3.7	3.6	7.4
■	total	2.4	5.0	7.4	3.6	5.0	3.5	5.0	3.1	5.0	8.1
	DNA	2.4	4.6	6.9	3.5	4.9	4.4	5.0	3.4	4.8	8.2
	filter	2.8	4.2	7.0	3.7	4.7	3.6	5.0	3.4	4.6	8.0
▲	total	3.0	3.7	6.6					3.0	3.7	6.6
	DNA	3.1	3.5	6.6					3.1	3.5	6.6
	filter	3.1	3.7	6.8					3.1	3.7	6.8

kit	template	総合評価	
		total	filter
●	total	14.0	13.9
	filter	14.8	14.8
	DNA	13.8	13.6
■	total	13.9	
	filter	14.3	
	DNA	13.4	
▲	total	13.4	
	filter	13.5	
	DNA	13.6	



	2007年▲	2008年●	点
A	0	0	80
B	1	8	75
C	8	7	60
D	9	8	



	2007年▲	2008年●	点
A	5	6	80
B	4	7	75
C	7	4	60
D	2	6	

Fig. 1 Luminex 法で HLA-class I and II typing 成績の比較 (2007 v.s 2008)

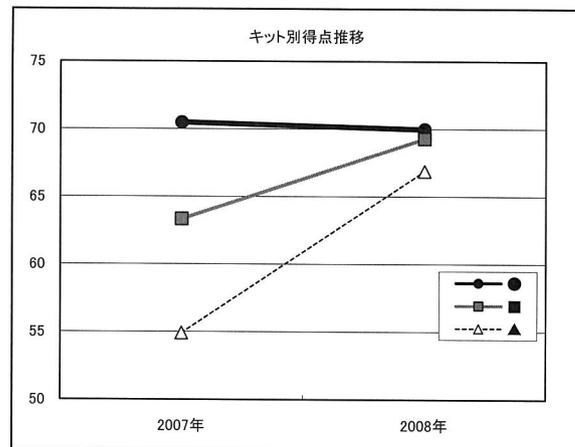
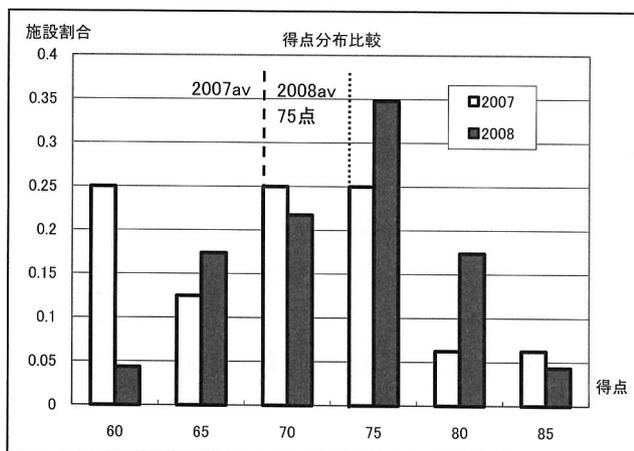


Fig. 2 施設別、キット別 Luminex 法による HLA-class I and II typing の総合得点の比較 (2007 v.s 2008)

は●であり、3種のキットともに良い評価であった。

5. 前年度と今年度の比較

Fig. 1 に 2007 年度と 2008 年度の QC の成績を比較した。横軸は P/N 比での得点，縦軸は PCR 精度の得点を示す。

HLA-class I は，昨年度の成績と比較し，75 点以上の得点を示す施設の増加 (5% → 35%) がみられ，Luminex 法による HLA-class I typing の精度向上がみられた。しかしながら PCR 精度と Typing Technique が共に 80 点以上を示す施設はなかった。今後の目標となる。

HLA-class II は両年度ともに 80 点以上の高得点を示す施設があり，かつ今年度はその増加が見られた。年度ごとの着実な typing 精度の向上がみられ，今後もその継続が望まれる。

Fig 2 に施設とキット別に総合評価の比較を示した。施設では昨年に比べ平均点で 5 点増加しかつ全体的な右よりのシフトがみられた。キットでは昨年最優秀キットは使用施設の増加にもかかわらずその精度の持続がみられ，その他のキットは優秀なキットに近づく改良がなされていることが分った。今後もこの傾向の持続が望まれる。

第12回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —SSP 法, RFLP 法—

石井博之 (大阪府赤十字血液センター)

1. 概況

SSP 法の参加施設は、19 施設で、昨年より 4 施設減少した。SSP 法のみでの報告はクラス I, II でそれぞれ 11 施設であった。その他の施設は他の方法の補助として SSP 法を使用していた。使用キットについては、ほとんどの施設が One Lambda 社製の Micro SSP を使用しており、Pel-Freez 社製の UNITRAY, 自家製がそれぞれ 1 施設であった。また、SSP 法は他の方法に比べて、使用する DNA 量が多いため、ろ紙試料の H2005, H2006 は、タイピングを避けた施設が多くみられた。今回は、WGA 法の使用状況を各施設に問い合わせ調査したところ 2 施設で使用されていた。1 施設は H2004~H2006, もう一方の施設はすべての検体について WGA 法を使用していた。RFLP 法については、2 施設の参加があり試薬は自家製であった。

2. 解析結果

2.1 SSP 法

解析については、複数施設において採用されているキットについてのみ行った。

1) Micro SSP HLA class I and II ABDR DNA Typing Tray, Lot#006

3 施設の参加があった。このキットについては、偽反応がなく、スコアの転記ミスも少なかった。また結果の表記も各施設共にほぼ一致しており、問題点はみられなかった。

2) Micro SSP Japanese class I and II ABCDRDQ DNA Typing Tray, Lot#003

7 施設の参加があったが、1 施設は偽陽性、3 施設が偽陰性反応によるタイピングミスがあった。偽反応については、ローカスおよびサンプルに共通なも

のではなく、キットの問題はないと考えられる。また、同一の施設、複数の検体で誤判定と考えられるタイピングミスが 4 件もみられた。

3) Micro SSP Generic HLA class I DNA Typing Tray, Lot#006

参加 4 施設中 2 施設において、偽陽性または偽陰性反応がみられた。また、検体 H2005

と H2006 を取り違えたと考えられるタイピングミスが 1 件あった。この施設は SSP 法単独での参加で、他のキットの結果も H2005 と H2006 は逆になっていた。この施設は WGA 法をすべての検体について行っており、その段階で検体を取り違えたか、またはろ紙試料から DNA を抽出する際に取り違えた可能性が考えられる。

4) Micro SSP Generic HLA class II DNA Typing Tray

前述のクラス I のキットと同一施設がセットで使用していた。このキットにおい

ても、偽陽性または偽陰性反応がクラス I と同じ施設にみられ、技術的な問題がある

のではないかと考えられる。

5) Micro SSP Allele Specific HLA Class I, II DNA Typing Tray

A*24, B*15, DRB1*04 のキットについてのみ解析を行った。A*24 のキットについては、参加全施設問題なくタイピングできていた。B*15 のキットでは、検体 H2003 (B*1528) において B*1528 のプライマーセットの反応が参加 3 施設中 2 施設が偽陰性となっていた。DRB1*04 のキットでは、判定時のミスによるタイピングミスが 1 件みられた。

2.2 RFLP 法

データの解析は、2施設のみ参加で試薬も自家製のため、実施していないが、タイピング結果については、他法の結果とよく一致していた。

3. まとめ

SSP 法では、判定ミスやスコアの転記ミス、検体の取り違い等、初歩的なミスが多いように思われた。また偽反応も多くみられた。SSP 法では1つのプラ

イマーセットでアレルタイプが決まることが多く、偽反応があった施設においては、技術的な見直しが必要であると考えられる。タイピング結果の表記法については、施設間でかなり異なっていた。実際その施設で運用している表記法があると思われるが、QCWS では「検査結果の記載法と結果報告書表記法およびアンビギュイティの取扱い原則（2003年度）」に従い報告することが望まれる。

第12回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —SBT 法—

石井博之 (大阪府赤十字血液センター)

1. 概況

SBT 法の参加施設は、全10施設 (昨年と同様) あり、クラス I で9施設、クラス II では7施設であった。10施設中、3施設は SBT 法のみ、他は SSO 法との併用が多く見られた。使用キットはほとんどの施設が AlleleSEQR を使用しており、SeCore、自家製がそれぞれ1施設であった。

2. 解析結果

2.1 SBT 法

今回、多施設で増幅不良による検査不能な検体があった。検体 H2001 の HLA-A が参加9施設中6施設が増幅不良のため検査不能になっていた。同一検体の HLA-B は3施設、HLA-C は2施設が検査不能であった。HLA-DRB1 については全施設問題なくタイピングできていた。各ローカスの PCR 後のフラグメントサイズを見てみると、Allele SEQR の HLA-A は 2 kb と他のローカス (B:1.2+1.5 kb, C:1.2 kb, DRB1:300b) と比較して長く、増幅しにくかったと考えられ、DNA 検体自体に何らかの問題があったと思われる。SBT 法以外の方法での検査状況も確認し

たが、特に問題はなさそうであった。また、ろ紙試料である H2005, H2006 についても、十分な DNA 量が得られないためか特にクラス I での増幅不良による検査不能となった施設が数施設みられた。

タイピング結果については、おおむね一致していたが、HLA-A で2件、HLA-DRB1 で1件の不一致が見られた。不一致の見られた3件については、生データを各施設の協力により確認することができた。HLA-A の1件については、H2003 で、(A*0201/04/12/+, A*2402/03/13/+) が (A*0212/36, A*2413/33) と判定されていた。この2つの組合せは、エクソン 2, 3 の判定では識別不能であり、エクソン 4 での判定ミスによるものと考えられた。もう1件については、H2005 で、(A*0201/04/12/+, A*2402/03/13/+) が (A*0212/36/87/+, A*2403/13/28/+) と判定されていたが、当施設で生データを確認したところ問題なく (A*0201/04/12/+, A*2402/03/13/+) と判定できた。当該施設から、判定用ソフトのバグの可能性があると連絡があり、今後注意が必要である。上記の2件については、SBT 法と SSO 法の併用であったが、SSO 法では上記のアレルは識別不

能であった。HLA-DRB1 の不一致 1 件については、H2005 で、(DRB1*0802, DRB1*1406) が (DRB1*0802, -) と判定されていた。生データを確認したが多型部分がまったくなく (DRB1*0802, -) の判定結果となった。各塩基のシグナル値を確認したところ、通常の 1/10 程度しかなく増幅不良により、DRB1*1406 が検出できなかった可能性がある。この検体の他のローカスの結果を確認したところ、HLA-A, B, C すべて増幅不良により検査不能であった。

3. まとめ

SBT 法については、判定用ソフトや用いるデータベース等により、若干の表記の違いがあると考えられるが、参加全施設で 4 桁、6 桁レベルで遺伝子型の同定ができており、他法と比べ高精度な遺伝子型の同定に有効な方法であることが確認された。しかしながら、特にクラス I の増幅領域が他法に比べ長く、用いる DNA の状態によっては増幅がうまく行かないことがあり、SBT 法単独でタイピングを行う場合は十分な注意が必要である。

第 12 回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —WGA 法—

安波道郎 (長崎大学・熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野)

全ゲノム増幅法 (Whole genome amplification, 以下 WGA 法) は、限られた量の DNA 検体から DNA ポリメラーゼを用いて正確に複製して十分量の DNA を得るもので、 ϕ 29 フェージ由来 DNA ポリメラーゼを使用した multiple strand displacement 法に基づくものがキット化され市販されている。過去数年の HLA-QC ワークショップの結果、HLA タイピングにおいては誤った結果が導かれる原因にはならないようであるが、個々の反応性は増幅前と整合しないこともある。

検体 DNA 量が十分に得られる輸血・移植検査の現場ではほとんど適用されてなく、2008 年 8 月に今回の HLA-QC ワークショップ DNA 部門に参加した 57 施設を対象に聞き取り調査したところ、回答 42 施設中 1 施設のみが日常的に施行しており、7 施設は「経験あるが日常的には施行していない」、34 施設 (81%) は「WGA 法の経験ない」という状況であった。

WGA 法の HLA タイピング結果に及ぼす影響

第 12 回 HLA-QC ワークショップ配布試料 H2004 は、H2002 として DNA 溶液の形態で配布されたもとの細胞を検体保存用紙「FTA Elute」に付着させた試料である H2006 から Qiagen 社の「REPLI-G キット」を使用して WGA 法により調製したものである。したがって、WGA 法の HLA タイピングに及ぼす影響は、H2002 と H2004 の結果の一致度から評価できる。解析結果と総合判定の諸項に記述されているように、WGA 法を適用した H2004 の方が劣るということとはなかった。

個々の反応性については、SSP 法 SSO 法ともに H2002 と H2004 間での不一致がわずかながら散見され、それによる方法論毎のアサインメントに不一致 (不正解) を生じているようである。しかし、この不一致は H2002 にも見られ、WGA 法を適用した H2004 の方が高頻度ということとはなかった。

ワークショップ参加者の WGA 法についての印象・評価

前述の聞き取り調査で、実施状況にあわせて、WGA 法に問題があるかを問い合わせたところ、経験施設のほとんどが、「概ね問題はないが若干の問題はある」と回答した。「問題」の内容としては、「ア

リル間で同等に増幅されず偏ってしまう」、「元試料の質（および量）によっては信頼性が落ちる」、「SSP でエクストラな反応が出る」などであったが、①元試料の質に配慮すること、②複数の方法で確認することの2点でほとんど問題は解決できるととらえられていた。

第 12 回 HLA-QC ワークショップレポート (DNA 部門) —NA タイピングおよび HLA 型結果表記法および検体の HLA ハプロタイプについて—

田中秀則 (日本赤十字社 血液事業本部 中央骨髄データセンター)

1. はじめに

日本組織適合性学会では、HLA-QC ワークショップ (以下、QCWS) における DNA タイピングの結果表記を「検査結果 (ワークシート) 記載法と結果報告書表記法およびアンビギュイティ (ambiguity) の取扱いの原則 (2003 年度版)」(以下、表記法) に従い結果の表記を行うこととしている。また、結果の提出時に、DNA タイピング結果に対応する HLA 抗原型 (以下、HLA 型) についても結果を報告することとしている。

これまで、過去 5 回の QCWS 結果表記の解析法として、提出された結果表記例を集計し、結果表記の問題点について報告を行ってきた。今回は、各参加施設から報告された結果表記を採点し、各参加施設における結果表記の問題点を明らかにした。また、今回配布された検体が日本人由来の検体であることから、各検体の HLA ハプロタイプの国内における分布および頻度について検討を行った。

2. 方法

結果表記の採点は、以下の 5 項目①ローカス名の表記、②アスタリスクの表記、③アンビギュイティ

(ambiguity) の表記、④ HLA 型の表記、⑤その他の表記 (undef, ブランク表記等) について採点を行い、正しい結果が表記された場合は、30 点となる採点を行った (配点等は QCWS ホームページ参照、以下 HP)。

3. 結果および考察

採点の結果、57 施設中正しく結果が表記された施設は、約半数の 28 施設であった。また、結果表記に一部不備あった施設 14 施設 (採点結果: 25~29 点) を含めると、約 7 割の施設で概ね結果表記法に大きな問題点がない状況であった。

採点の対象となった 5 項目の表記の不備については、HP にその詳細が掲載してあるので参考にして頂きたい。

また、HLA ハプロタイプについては、今回配布された検体で、3 検体 (H2002, H2004, H2006) が同一細胞由来の検体であることから、4 検体 (H2001, H2002, H2003, H2005) の HLA ハプロタイプについて解析を行った。これら 4 検体の HLA タイプから 7 種類の HLA ハプロタイプが推測され、4 種類のハプロタイプが 0.01% 以上の頻度で、残り 3 種類は

0.01% 未満の頻度で日本人に存在すると推測された (HP 参照)。また、それぞれのハプロタイプの分布に

も特徴があると推察された (HP 参照)。

第 12 回 HLA-QC ワークショップレポート (抗体部門) — 企画と実施内容・総合解析 —

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

1. はじめに

平成 17 年から開始された抗体部門は 4 回目となり、今回は解析方法と配布サンプルに工夫を施した。目的は従来どおり一貫しているが、施設間における結果の整合性を強化する狙いで、検査方法別グループ解析を取り入れた。検査方法別の解析リーダーを設定し、電子メールを主体とした、参加者双方のやりとりで技術的問題点や解析精度の向上を目指した。

これまで配布サンプルは 4 本で、参加施設の現状に見合った結果を集積してきた。今回は、6 本に増やし HLA 抗体が検出できたかどうかについて結果を求めた。抗体特異性については、指定した 2 本について、検査可能な施設は実施していただいた。

2. 企画と実施内容

2.1. 実施経過

本年はワークショップ集会在例年どおりの日程であったため、ほぼスケジュールに沿って実行できた。新たにグループ解析を導入したため、解析期間がもう少し充当できるよう、配慮する必要があった。

2.2. サンプルの選択と配布

使用するサンプルは前年に続き、赤十字血液センターから提供されたものを使用した。抗体検出に重点を置いたことから、必ず検出できるサンプルの他、バックグラウンド成分の高いもの、抗体性状が市販試薬で検出しづらいもの、Non-HLA の疑いのある微

弱な抗体など日常遭遇すると考えられるサンプルを選択した。最近、HLA 抗体検出試薬の一部では、MICA 抗体が同時に検出可能となっており、HLA 抗体陰性で MICA 抗体を保有するサンプルも配布した。

参加施設には 1 ml ずつ配布し、取扱いに関する誓約書の返送を義務付けた。同時に問い合わせに関する事項も同意を求め、検査方法別のグループ解析に備えた。

2.3. データ収集

データの収集は前回と同様に Microsoft Excel で作成した統一形式の入力ファイルを配布した。一つのファイルに方法別のシートを作成し、メニュー形式で入力可能としてある。追加される画像データファイル、測定データファイルなども収集時の混乱を防ぐため、ファイル名のネーミングを一定のルールで統一した。

2.4. 参加施設と検査方法別集計

参加施設が例年約一割ずつ減少している傾向は変わらず、血液センターの減少が主原因である。方法別で、LCT と MPHA が減少していることも同じ理由による。他の方法については、この 4 年間ほとんど変化ない。

2.5. 解析

収集したデータは事務局で一旦まとめ、各施設に再配布した。前述のごとく検査方法別のグループ解

析を導入し、ワークショップ集会での報告は、使用頻度の高いFlowPRAとLABScreenに絞り、時間を十分取れるようにした。他の方法については、解析結果のホームページ掲載と学会誌報告という形をとった。

3. 総合解析

ここでは、全体的な解析について述べ、検査方法別の解析は検査方法別各論を参照されたい。

3.1. HLA 抗体検出率

SH2001とSH2005とSH2006は、LCTでも高力価を示す抗体であり、検出率100%を達成する予測であった。しかし、そのLCTの結果が一部施設で十分でなかったため、それぞれ97%に留まった。他の検査法ではクラスI (IgG) で100%検出できた。

SH2002は、LCTで検出可能なIgM性の抗体で、二次抗体に抗IgM抗体を使用した施設は、100%検出できていた。IgGは陰性であるため、全体の検出率は36%に留まるが、その数字は、各施設の検出目的によって変動するので意味がない。

SH2003は、バックグラウンド・レベルの高いHLA抗体陰性かつMICA抗体陽性のサンプルである。FlowPRAやLABScreenのような高感度な試薬は、判定を誤る可能性があり、実際に数施設が陽性判定をしていた。

SH2004は、Non-HLA反応の疑いのある微弱なクラスII抗体である。抗体特異性が鋭敏な反面、反応強度は微弱である。その検出率は全体で59%であった。このような反応は、施設の検出目的によって判断されるところであろうが、今のところ、本来のHLA免疫による抗体反応であるか、何らかのクロス反応であるか明確に識別する方法がない。

3.2. HLA 抗体特異性

3.2.1 SH2005

抗体特異性は、どの抗原と反応しているか判定すればいいのだが、HLA抗原は各ローカスでヘテロ接合の状態であり、反応する抗体も複数ローカスにおよぶと、実際、どの抗原と反応しているか確定困難である。今回の、SH2005とSH2006は、抗体陽性

率が80%以上で、その特異性決定は困難である。このような場合、許容抗原(血清に反応しない抗原)解析からその糸口を見つける方法が有効である。

SH2005の許容抗原はHLA-A24, A33, B54, Cw1, Cw8などで、ここに本人タイプも含まれ、A24-B54-Cw1のハプロタイプが推測できる。したがって、これ以外の抗原に抗体特異性が含まれることになる。LABScreen Single antigen 試薬では、HLA-A10, A11, B5, B15, B40, Cw3, Cw7などの特異性が確認できるが、このような高価な試薬を使用しなくても、許容抗原とその交差反応性である程度の推測は可能である。

3.2.2 SH2006

SH2006は、LCTでHLA-A9以外のAローカス抗原と反応する抗体を有している。精製抗原による高感度法でみると、HLA-B15, B35などの反応も確認できる。

A9抗原に関しては、A*2301, A*2402との反応は陰性であるが、A*2403とは強く反応する。これらのアミノ酸配列を比較すると、166-167番目に相違が認められる。前者は¹⁶⁶⁻¹⁶⁷DG、後者は¹⁶⁶⁻¹⁶⁷EWの配列を形成しており、この差を抗体が識別していると推測される。ところが、¹⁶⁶⁻¹⁶⁷EWはBローカスにおいてはコンセンサス配列であり、この抗体と反応しないHLA-B7, B40関連抗原もこの配列を有しているので矛盾が生じる。視点を変えて、他のアミノ酸配列を調べると、138番目にローカス特異的な配列が存在する。Aローカスは¹³⁸M、Bローカスは¹³⁸Tであり、これらを含めた何ヶ所かのアミノ酸とその相違に起因する抗原分子の構造変化をエピトープと認識して、反応が成立していると推測される。

この抗体が反応すると推測される¹³⁸M、¹⁶⁶⁻¹⁶⁷EWの特異性はLCTの結果と一致する。精製抗原のみで確認できる特異性は、別の部位をエピトープとして認識しているものと考えられる。さらに、HLA-B16やCw6, Cw7などの微弱な反応も含まれ、それらの特異的な配列は、抗原決定基とは考えにくい位置に存在するため、Non-HLA反応の可能性が高い。

表 1 検体別 HLA 抗体特異性

	サンプル ID	HLA			MICA
		LCT	IgG	IgM	IgG
HLA Class I MICA	SH2001	B15+Cw3+A10+	B15+B35+Cw3+A10+A11+A2+	B15+B35+Cw3+A10+A11+A2+	(-)
	SH2002	B12+B76	(-)	B12+B76	(-)
	SH2003	(-)	(-)	(-)	MICA19(+04)
	SH2004	(-)	(-)	(-)	(-)
	SH2005	B15	B15+B35+Cw3+A10+A11+	(-)	MICA19+17(+02)
	SH2006	A Locus multi	A Locus multi+B15+B35+	(-)	(-)
HLA Class II	SH2001	DR9	DR9+DR53+DQ3+	DR9+DR53	
	SH2002	(-)	(-)	(-)	
	SH2003	(-)	(-)	(-)	
	SH2004	(-)	DR7	(-)	
	SH2005	(-)	(-)	(-)	
	SH2006	DR52	DR52+DQ7	(-)	

4. まとめ

今回は、Broad specific 抗体から、抗体特異性を見出す手法として、許容抗原解析、本人タイプ、エピトープ解析 (交差反応性含む) などの情報を活用する例を示し、解析精度の向上を示した。表には、各サンプルの抗体特異性をまとめた。

一方、各論で述べられる検査方法別解析では、使用頻度の高い FlowPRA と LABScreen を重点的に取り上げ、前者は機器設定の適切性、後者は操作に起

因するコントロール値の変動に、結果が乖離する原因が確認できた。

さらに、その施設が輸血関連であるか、移植関連であるかによって結果の取り上げ方で方向性が異なることも考えられ、今後は、分野別の解析を導入していく必要性を感じた。参加各施設はこれらのデータを検証し、自施設の各設定や条件を改善し、施設間で同一の結果が得られる環境を目指したい。

第 12 回 HLA-QC ワークショップレポート (抗体部門) —LCT・AHG-LCT 法—

寺木佳子 (東京都赤十字血液センター 検査部 検査三課)

1. 概要

今回のワークショップにおいて LCT 法での参加施設は、クラス I が 6 施設、クラス II が 2 施設であった。提出されたパネル細胞は、クラス I が 160 パネル、クラス II が 11 パネルであった。AHG-LCT 法 (クラス I のみ) での参加施設は 2 施設で、提出され

たパネル細胞は 143 パネルであった。参加施設数、提出パネル数とも表 1 に示したように、前回ワークショップに引き続き減少していた。

判定結果提出のあった施設から提出されたクラス I 抗体判定結果の概要を表 2 に示した。

LCT 法において、SH2001, SH2002, SH2005 はい

ずれも1施設を除き抗体陽性と判定された。SH2003およびSH2004は全施設が陰性、SH2006は全施設が陽性と判定していた。

AHG-LCT法では、SH2001, SH2002, SH2005, SH2006が陽性、SH2003およびSH2004が陰性の判定であり、参加2施設の結果は一致していた。

なお、クラスII抗体については、提出されたパネル細胞が11パネル、アサインされていた抗原がDRローカス6抗原のみであったため、今回は解析を行うことができなかった。

2. 解析

クラスI抗体陽性と判定されたサンプルの反応性について、提出されたデータを用いてセログラフを作成し解析を行った。LCT法については特定施設のパネルで弱反応が認められたため、施設を選択して最終的な解析を行った。

SH2001: LCT法でCw9, B62, B71, B75抗原に

対する良好な反応を認めた。また、A2, A26, A11, B35抗原とも一部反応が認められた。AHG-LCT法では、LCT法で反応の弱かったA2, A26, A11抗原を有するパネルとも良好な反応を示し、さらにA25, B52, B59抗原に対する反応も認められた。

SH2002: LCT法でB44, B45抗原と反応を認めた。AHG-LCT法ではB45抗原を有するパネルの提出がなかったため反応性を確認することができなかったが、B44抗原に対する反応はLCT法と同様であった。QCワークショップ部会で事前に確認されていたB76抗原に対する反応は、パネルの提出がなかったため検出されなかった。IgM単独抗体であったため、他の検査方法と比べ、LCTおよびAHG-LCT法での反応が良好であった。

SH2005: LCT法でB62, B75, B71抗原と良好な反応を示し、B35抗原とも弱い反応を認めた。AHG-LCT法ではLCT法で認められた特異性に加えB51, B52, Cw4, Cw9, Cw10抗原と強く、B44, B46, A1,

表1 参加施設数および提出パネル数

	第12回 HLA・QCWS		第11回 HLA・QCWS		第10回 HLA・QCWS	
	参加施設数	提出パネル数	参加施設数	提出パネル数	参加施設数	提出パネル数
LCT法 クラスI	6	160	11	388	16	584
LCT法 クラスII	2	11	2	6	4	47
AHG-LCT法	2	143	10	345	14	576

表2 報告された判定結果

クラスI

サンプルID	LCT法判定 (6施設)	AHG-LCT法 判定(2施設)	抗体特異性
SH2001	陽性: 4 陰性: 1	陽性: 2 陰性: 0	Cw9 B62 B71 B75 B35 A26 A25 A11 A2 A68
SH2002	陽性: 4 陰性: 1	陽性: 2 陰性: 0	B44 B45
SH2003	陽性: 0 陰性: 5	陽性: 0 陰性: 2	陰性
SH2004	陽性: 0 陰性: 5	陽性: 0 陰性: 2	陰性
SH2005	陽性: 4 陰性: 1	陽性: 2 陰性: 0	B62 B71 B75 B35 B46 Cw9 Cw10 Cw4 B51 B52 B44 A1 A3 A11
SH2006	陽性: 5 陰性: 0	陽性: 2 陰性: 0	A2 A68 A25 A26 A11 A30 A31 A33 B62 B71 B75 B52
	未判定施設: 1		

クラスII

サンプルID	LCT法判定 (2施設)
SH2001	陽性: 1 陰性: 0
SH2002	陽性: 1 陰性: 0
SH2003	陽性: 0 陰性: 1
SH2004	陽性: 0 陰性: 1
SH2005	陽性: 1 陰性: 0
SH2006	陽性: 1 陰性: 0
	未判定施設: 1

A3, A11 抗原とは弱く反応を示した。

SH2006: LCT 法で A2, A68, A25, A26, A11, A30, A31, A33 抗原と良好な反応を認めた。AHG-LCT 法では B62, B71, B52 抗原とも一部反応が認められた。

3. まとめ

今回のワークショップにおいて、LCT 法で凍結細

胞のみを用いてデータ提出を行なった 1 施設でサンプル SH2001, SH2005 について、提出パネル数の少なかった 1 施設でサンプル SH2002 についてクラス I 抗体が検出されていなかった。参加施設数、提出パネル数とも減少してきている傾向から、施設間差と相まって、今後、LCT 法および AHG-LCT 法での詳細な解析が難しくなってくるのが考えられる。

第 12 回 HLA-QC ワークショップレポート (抗体部門) —MPHA 法・PAKPLUS 法, LAT 法—

佐藤一弘 (宮城県赤十字血液センター)

1. はじめに

MPHA, PAKPLUS, LAT の原理および各法の特徴を表 1 に示す。すなわち MPHA は混合受身凝集法, PAKPLUS および LAT は ELISA 法を測定原理とし HLA 抗体を検出する。

それぞれの検査法を用いた参加施設を表 2 に示す。第 12 回 QCWS には全国から 36 の施設が参加しており、そのうち MPHA (オリビオ II) 5 施設, MPHA (パネル) 5 施設, PAKPLUS 3 施設, LAT が 4 施設の参加で、前回ワークショップとほぼ同数の参加であった。また、3 法で参加した殆どの施設が追加検査として Flow-PRA 法や LABScreen などの高感度検査法を併用し実施していた。なお、検査法の特徴よりクラス II 抗体の解析は省略する。

2. 結果

HLA 抗体の有無に関しては 3 法とも全ての施設において不一致は認められなかった (表 3)。しかし、IgM 性抗体である SH2002 は抗ヒト IgG 抗体感作セル (MPHA), Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-Human IgG (LAT) を用いた施設での抗体検出は認められず、IgM 標識抗体を用いた PAKPLUS で

のみ HLA 抗体が検出された。例数が少ないが同じ PAKPLUS でも IgG/A/M 標識抗体で抗体検出できなかったのは二次抗体の量が関与している可能性が高いと考えられる。

また、抗体の有無に関して施設間の相違は認められなかったものの、詳細な反応をみると MPHA, LAT においてそれぞれ相違が認められた。MPHA で異なる結果を示した例を表 4, 5 に示す。表 4 はクロロキン処理の結果が 4 施設とも全て異なっており検出される抗体特異性に違いが生じている。要因としてクロロキン処理方法の技術的な問題が示唆される。表 5 は未処理においても異なる結果となった例である。MPHA の場合特別な機器を必要としない、そのため検査試薬の Lot が同じで、かつ感作時間等に違いがないにも関わらず結果が異なる要因として、① 技術的な問題 (特に洗浄操作), ② 凝集像の判断の違いによる 2 点が考えられる (表 6)。

技術的な問題は PAKPLUS でも同様に洗浄不良で二次抗体が中和された場合期待される結果とはならないし、LAT においてもテラサキトレーでの洗浄操作に繊細な操作が求められ、また発色の判定も目視と機器で行うのでは最終的な結果は異なってくる。

表1 MPHA/PAKPLUS/LAT 検査法の特徴

	MPHA	PAKPLUS	LAT
標的抗体	HLA 抗体 HPA 抗体	HLA 抗体 HPA 抗体	HLA 抗体
測定原理	凝集法	ELISA 法	ELISA 法
使用抗原	血小板	血小板 GP	抽出抗原
クラス I/II	クラス I	クラス I	クラス I & II
HLA 抗体 特異性決定	劣る	不向き	やや劣る

表2 MPHA/PAKPLUS/LAT 検査法での参加施設

	MPHA		PAKPLUS	LAT (判定)	その他の検査法
	オリビオII	パネル			
20S007	○	○			
20S009	○				LIFT、WAKFlow
20S014	○				FlowPRA
20S018		○	○	○ (機械)	FlowPRA、LABScreen
20S021		○	○		FlowPRA
20S023				○ (目視)	
20S025		○	○		FlowPRA、WAKFlow
20S027	○				FlowPRA、WAKFlow
20S030	○	○			LABScreen、WAKFlow
20S031				○ (目視)	FlowPRA、LABScreen
20S034				○ (目視)	FlowPRA
実施施設	5/36	5/36	3/36	4/36	

表3 MPHA/PAKPLUS/LAT 法検査結果一覧 (HLA 抗体の有無)

●MPHA (オリビオII クロロキン未処理)

	Lot	感作セル	2001	2002	2003	2004	2005	2006
20S007	70912	IgG	8	1	1	1	8	8
20S014	80514	IgG	8	1	1	1	8	8
20S027	70719	IgG	8	1	1	1	8	8
20S030	80410	IgG	8				8	8

●MPHA (パネル クロロキン未処理)

	Lot	感作セル	2001	2002	2003	2004	2005	2006
20S007	80213	IgG	8	1	1	1	8	8
20S021		IgG	8	1	1	1	8	8
20S025		IgG	8	1	1	1	8	8
20S030		IgG	8	1	1	1	8	8

●PAKPLUS

	Lot	二次抗体	2001	2002	2003	2004	2005	2006
20S018	051007-PPB	IgG	8	1	1	1	8	8
		IgM	4*	8	4*	4*	4*	4*
20S021	012507-PP	IgG/M/A	8	1	1	1	8	8
20S025	121207-PP	IgG/M/A	8				8	8

*判定不能

●LAT

	Lot	二次抗体	2001	2002	2003	2004	2005	2006
20S018	Mix:10 Single:6	IgG	8	1	1	1	8	8
20S023	Single:6	IgG	8	1	1	1	8	8
20S031	Mix:11	IgG	8	1	1	1	8	8
20S034	#004	IgG	8	1	1	1	8	8

表4 MPHA (パネル) における判定結果不一致について (その1)

2001		80213						20S007		20S021		20S025		20S030	
No	使原抗原	A(1)	A(2)	B(1)	B(2)	C(1)	C(2)	処	未	処	未	処	未	処	未
1	A	24	26	54	61	1	10	1	8	1	8	1	8	1	8
2	B	24		54	62	1	9	1	8	1	8	1	8	1	8
3	C	2	33	51	58	10	14	6	8	6	8	8	8	2	8
4	D	24	26	7	35	7	9	6	8	1	8	6	8	1	8
5	E	2	24	7	51	7	15	2	8	1	8	2	8	1	8
6	F	2		46	48	1	9	8	8	1	8	8	8	2	8
7	G	2	11	35	39	7	8	6	8	2	8	6	8	1	8
8	H	2		35		9		8	8	8	8	8	8	2	8

表5 MPHA (パネル) における判定結果不一致について (その2)

2005		80213						20S007	20S021	20S025	20S030
No	使原抗原	A(1)	A(2)	B(1)	B(2)	C(1)	C(2)	未	未	未	未
1	A	24	26	54	61	1	10	6	1	6	1
2	B	24		54	62	1	9	8	8	8	8
3	C	2	33	51	58	10	14	8	8	8	8
4	D	24	26	7	35	7	9	8	8	8	8
5	E	2	24	7	51	7	15	8	8	8	8
6	F	2		46	48	1	9	8	8	8	8
7	G	2	11	35	39	7	8	8	8	8	8
8	H	2		35		9		8	8	8	8

表6 MPHA 各施設の分析条件

	試薬 Lot	処理時間	感作時間
20S007	80213	2 時間	Overnight
20S021	80213	2 時間	Overnight
20S025	80213	2 時間	Overnight
20S030	80213	2 時間	Overnight

同一血清、同一 Lot、同一条件に関わらず判定結果が異なる

原因： ①手技 (特に洗浄)
②目視判定による違い
(目視の不確かさ)

3. まとめ

同一試薬 Lot で検査し感作時間等も同じであるなら結果も同じとならなければならない。異なる結果が出ることは臨床側でのその後の対応に違いが出ることを示唆し誰も望むことではない。手技・技術的な要因や目視判定の不確かさによる結果の相違につ

いては、施設間差をなくするためのテクニカルワークショップ開催が望まれる。また、結果に相違が認められる現段階においては、1法のみで結果を求めるのではなく、可能な範囲内で原理の異なる他法の併用が望ましいと考えられる。

第12回 HLA-QC ワークショップレポート (抗体部門) —LIFT 法—

宮崎 孔 (北海道赤十字血液センター)

LIFT 法は本年度は2施設のみの参加で、いずれも HLA class-I 抗体検査のみであり、1施設 (20S009) は抗体スクリーニング (SH2001~SH2006) と抗体特異性の確認 (SH2005, SH2006)、もう1施設 (20S015) は抗体特異性の確認 (SH2005, SH2006) のみの参加である。また、施設 20S009 は IgG と IgM を別々に測定、施設 20S015 は IgG と IgM を合わせて測定した結果となっている。参加施設が少ないため施設間差は評価できなかった。

提出された検体の HLA class-I 抗体の有無は正しく判定されていたが、IgM 抗体 (施設 20S009 のみ) については SH2002 は検出できていたものの、SH2001, SH2006 では検出できていなかった (表 1)。これは検出感度の低さに起因するものと考えられた。抗体特異性の解析においては概ね LABScreen Single Antigen (SA) 試薬と一致した結果であったが、一部に明らかな乖離が認められた (表 2, 表 3)。この原因として以下の理由が考えられる。

(1) 検出感度の差 【LIFT 陰性 (または判定保留), SA 試薬弱陽性】

SH2005: B55, B67, (B13, B27, B61, Cw10)

SH2006: B55, Cw7, (B39, B46)

(2) パネルリンパ球の抗原性 【1施設で LIFT 法陰性, 他施設の LIFT 法, SA 試薬陽性】

SH2005: A11, B7

SH2006: A33

(3) LIFT 法の非特異反応 【1施設で LIFT 法陽性, 他施設の LIFT 法, SA 試薬陰性】

SH2005: A3

SH2006: B13, B59

(4) 生リンパ球と精製抗原での HLA 抗体の反応性の差? 【2施設で LIFT 法陽性, SA 試薬陰性】

SH2005: A31, A33

SH2006: B44

上記 (1) については SA 試薬の非特異反応の可能性を否定できないが、今のところ確認する手段がな

表 1 LHA class-I 抗体スクリーニング

施設	Ig class	SH2001	SH2002	SH2003	SH2004	SH2005	SH2006
20S009	IgG	8	8	1	1	8	8
20S009	IgM	1	8	1	1	1	1
20S015	IgG+IgM					8	8

スコア

8: 陽性

4: 判定保留

1: 陰性

blank: 未検査

■ LIFT陰性 / FlowPRA, LABScreen 陽性

表2 LHA 抗体特異性 SH2005

抗原	20S009	20S015	SA
A1	4	4	8
A2	1	1	1
A3	4	8	1
A11	8	1	8
A24	1	1	1
A26	4	8	8
A30		8	4
A31	8	8	1
A33	8	8	1

抗原	20S009	20S015	SA
Cw1	1	1	1
Cw2			8
Cw4	4	4	8
Cw5			8
Cw6		4	8
Cw7	1	1	1
Cw8	4	4	1
Cw9	4	4	8
Cw10	4	1	8
Cw12			1
Cw14			1
Cw15	4		8

抗原	20S009	20S015	SA
B7	8	1	8
B13	4	1	8
B27	4	1	8
B35	4	8	8
B37	4	4	8
B38	4	8	8
B39	8	8	8
B44	8	8	8
B46	8	4	8
B48	4	8	8
B51	8	8	8
B52	8	8	8
B54	1	1	1
B55	1	1	8
B56	4	1	8
B58	4	4	8
B59	8	4	8
B60	4	8	8
B61	4	1	8
B62	4	8	8
B67	1	1	8
B71	8	8	8
B75	4	4	8

 LIFTのみ陰性
 LIFTのみ陽性

SA : LABScreen
Single Antigen

使用パネル数
20S009 : 85
20S015 : 50

表3 LHA 抗体特異性 SH2006

抗原	20S009	20S015	SA
A1	4	4	8
A2	8	8	8
A3	4	4	8
A11	8	8	8
A24	1	1	4
A26	8	8	8
A30		4	8
A31	8	8	8
A33	8	1	8

抗原	20S009	20S015	SA
Cw1	1	1	1
Cw2			1
Cw4	4	4	1
Cw5			1
Cw6		4	4
Cw7	1	1	4
Cw8	1	4	1
Cw9	4	1	1
Cw10	1	1	1
Cw12			1
Cw14	1		1
Cw15	1		1

抗原	20S009	20S015	SA
B7	1	1	1
B13	8	4	1
B27	4	1	1
B35	8	8	8
B37	4	4	4
B38	4	4	4
B39	4	1	4
B44	8	8	1
B46	4	1	4
B48	1	1	1
B51	8	8	8
B52	8	8	8
B54	1	1	1
B55	1	1	4
B56	4	4	8
B58	8	4	8
B59	8	1	1
B60	1	1	1
B61	1	1	1
B62	8	8	8
B67	1	1	1
B71	8	8	8
B75	8	4	8

 LIFTのみ陰性
 LIFTのみ陽性

SA : LABScreen
Single Antigen

使用パネル数
20S009 : 90
20S015 : 61

い。LIFT法の結果で許容抗原を設定する場合、検出感度の問題から患者血清と反応する可能性のあるドナーを選択する場合がある。ただし、ほとんどはSA試薬でのindex値が低い弱陽性であり、この場合、血小板輸血では輸血効果にさほど影響しない可能性もある。

上記(2)、(3)、(4)については結果の乖離の原因を特定することは難しい。LIFT法は、施設によってプロトコールが若干異なるため、施設間で結果が異なっている(2)、(3)についてはプロトコールによる差である可能性もある。(2)の1施設でのみ陰性を

示した抗原については、許容抗原として選択された場合、血小板輸血不応を起こす可能性が高い。LIFT法のHLA抗体検出能は使用するパネルリンパ球に依存するため、正確な結果を出すためには数多くのパネルを用意する必要がある。この点はHLA抗体スクリーニング法としてFlowPRAやLABScreen試薬に比べて大きな欠点となる。

上記のように検査法により結果が不一致となる例については、今後臨床データを収集し、その抗体の意義について検証することが必要である。

第12回 HLA-QC ワークショップレポート (抗体部門) —HLA 抗体検出試薬 (WAK Flow HLA クラス I & II 抗体 (MR))—

田中秀則 (日本赤十字社 血液事業本部 中央骨髄データセンター)

1. はじめに

日本人に多く見られるHLA抗原およびHLAハプロタイプを保有するパネル細胞(EBVトランスフォーム細胞)から抽出した精製HLA抗原を使用し、蛍光ビーズ上でHLA抗体を検出する試薬であるWAK Flow HLA クラス I & II 抗体 (MR) から得られた結果について検討を行った。

HLAクラスI抗体検出用試薬に用いたパネル細胞は、許容抗原確認を容易にすることおよび抗体検出感度を高めることを目的として、①HLA-B抗原型の組合せが、同じ交差反応抗原群(例: B54とB55, B60とB61等)であること、②HLAハプロタイプがホモ接合(例: A24-B52-Cw12ホモ接合等)であることを考慮し、日本人の遺伝子頻度が1%以上のHLA抗原が網羅出来るように選択を行った(QCワークショップホームページ参照, 以下HPと表記)。また、HLAクラスII抗体検出用試薬に用いたパネル細胞は、①HLAタイプがホモ接合であること、②

HLA-DR抗原のサブタイプ(例: DR4.1とDR4.2等)が区分出来ることを条件に選択を行った(HP参照)。

2. 結果および考察

今回のHLA-QCワークショップ(以下、QCWS)の参加施設は、クラスI抗体が9施設、クラスII抗体が7施設であった。抗体検出に使用した二次抗体は、全施設で添付品(抗heavy chain & light chain)を使用しており、1施設で抗IgM抗体を二次抗体に用いた結果が提出された。また、クラスI抗体で4施設、クラスII抗体でも4施設で非特異反応の吸収を目的とした吸収操作を行ったデータが提出された(HP参照)。

提出された蛍光値(Luminex測定データのmedian値)のデータおよび蛍光値から算出されるIndex値(Negative Background Ratio)をFig. 1~Fig. 28にグラフで示した(HP参照)。

検体 SH2001 は、非特異的が疑われ 4 施設で吸収操作が行われた結果、吸収および未吸収検体での Index 値の平均が大きく異なっており (HP の Fig.3 および Fig.16 参照)、吸収操作が HLA 抗体検出に有効な例であった。

2.1. クラス I 抗体

蛍光値での施設間差は見られたが、Index 値での施設差は殆ど認められなかった。しかし、検体 SH2002 で施設番号 20S18 と 20S28 の Index 値が若干低い傾向にあった。陽性となった検体の抗体特異性は、SH2001, SH2005, SH2006 で広範囲の抗体特異性が、SH2002 で HLA-B44 の特異性が検出された。(HP の Table1 参照)

2.2. クラス II 抗体

検体 SH2003 と SH2005 は、他法の結果からクラ

ス II 抗体陰性であったが、施設番号 20S018 と 20S029 の Index 値が一部のビーズで 2.0 以上となり、偽陽性反応を示した。反応が見られた蛍光ビーズの抗原から SH2001 は DR9+DR7 が、SH2006 は DR52+DR8.2 の特異性が推察された (HP の Table1 参照)。また検体 SH2004 は、他法で DR7 の特異性が確認されている男性由来の検体であるが、本法では HLA 抗体は検出されなかった。

2.3. IgM 抗体

1 施設から IgM の HLA 抗体に関するデータが提出されており、検体 SH2001 と SH2002 にクラス I 抗体が、SH2001 にクラス II 抗体が検出された (特異性等について HP を参照)。また、それぞれの抗体特異性は、SH2001 が HLA-B15 関連抗原に、SH2002 が HLA-B44 抗原に対する抗体であった。

第 12 回 HLA-QC ワークショップレポート (抗体部門) —FlowPRA 法—

佐藤 壯 (札幌北楡病院)

1. はじめに

今回 FlowPRA 解析を担当するにあたり、従来の QCWS における報告用ファイルの情報 (判定スコア, 陽性率, ヒストグラム) だけでは十分な解析が難しいと考え、QCWS 部会の了解を得て参加施設に解析の基礎データである FCS ファイル (LABScreen 法における CSV ファイルと同様のファイル) 及びネガティブコントロール (以下 NC), ポジティブコントロール (以下 PC) データの追加提供を依頼した。紆余曲折はあったものの、最終的に参加 22 施設中 19 施設からデータを提供していただくことができた。この場を借りて担当者の方々のご協力に感謝申し上げます。なお、次回の QCWS データ提出に際しては FCS ファイル添付を必須とする方向で計画している。

2. 参加施設と測定項目・機器

参加施設を大学・病院, 血液センター関連, 検査会社に大別して測定項目毎に表示したのが表 1 である。IgM 抗体に関してはその測定意義が必ずしも明確にはなっていないが、一般に抗原感作によって最初に IgM 抗体が産生されその後 IgG 抗体が産生されることから、ランダム血小板輸血によって産生される HLA 抗体を早期に同定する目的のためか、測定しているのはすべて血液センター関連である。

測定機器はベクトン・ディッキンソン社 (以下 BD) が 12 施設, ベックマン・コールター社 (以下 BC) が 9 施設, オーソ社が 1 施設だった。

3. 測定結果

1) Screening Test (以下 SC)

今回の配布検体は6種類で、陽性検体を8あるいは6と判定、陰性検体を1と判定したものを一致と見なして集計したのが表2である。IgG抗体に関してはclass IがSH2003, class IIはSH2004の一致率が悪かった。表には示していないがclass I, IIを合わせた12項目すべてにおいて一致していたのはわずか8/19施設で半分に満たなかった。IgM抗体についても一致率はあまり良くなかった。

2) Single Antigen (以下 SA)

当然のことながらIgG抗体がターゲットで、対象となった検体はSH2005とSH2006, このうちSH2005はclass I抗体のみが陽性である。参加施設は9施設で、class I, class IIのみ解析が各1施設、両者解析が7施設。ただ、多くはgroup1から4までで、class Iのgroup1から10まで解析したのは1施設のみであった。詳細はホームページ上の解析結果を参照していただきたいが(以下HP参照)、解析結果の評価以前にCompensation不良のプロットが数多く認められた。残念ながら的確な解析が可能なのはわずか2,3施設程度であろう。

4. 考察

今回ポイントとなったのは、①バックグラウンドが高い検体を陰性と判定できるか(SH2003), ②DR7特異的な抗体のみの検体を陽性と判定できるか(SH2004)の二点である。

前者についてはシングルピークのヒストグラムがNCより右にシフトしているのを陽性と判定したのが

1施設、保留としたのが3施設そして陰性としたのが4施設であった。残る14施設はわずかに右にシフトしているものの多くはカットオフラインの左側に収まっている。そのような違いが生じたのは大会で報告したように設定条件の問題(図1)も考えられる。一般にflowcytometryを操作している技師の場合、NCをできるだけ低く設定する傾向にある。BDでは101, BCでは100程度に。ただそうするとその位置ではわずかの違いを拾ってしまうことになりかねない。添付文書にもあるとおりBDでは102, BCでは101程度に設定することにより非特異反応による影響を回避するのも有効だろう。また、あるいは洗浄操作の違いが影響しているかもしれない。これについては次回以降の課題である。

ただ、それ以前の基本的な問題はシングルピークのままNCより右にシフトした検体をどう判定するかである。確かにOne Lambdaの添付文書には“The positive sera may generate a single shifted peak or multiple peaks on the FL1 histogram.”という記載がある。しかしこの前半部分はやはりおかしい。SCは30種類のセルラインから抽出されたHLA抗原をコーティングしたビーズの混和物である。各アリのほぼすべての抗原を網羅できるような組み合わせが選択されており、したがって各ビーズはOne Lambdaが販売しているPC血清ですらマルチプルピークを作ることから分かります。この30種類のビーズが一様にシフトするとすれば、それはHLA抗原に対するモノクローナル

表1

		大学・病院	血液センター	検査会社	
SC	IgG	Class I	12	8	2
		Class II	11	6	2
	IgM	Class I	-	7	-
		Class II	-	3	-
Single Antigen		5	3	1	

表2

		SH2001	SH2002	SH2003	SH2004	SH2005	SH2006	完全一致施設
IgG	Class I	100%(22/22)	95.5%(21/22)	81.8%(18/22)	100%(22/22)	100%(22/22)	100%(22/22)	77.3%(17/22)
	Class II	94.7%(18/19)	100%(19/19)	100%(19/19)	52.6%(10/19)	100%(19/19)	100%(19/19)	52.6%(10/19)
IgM	Class I	100%(7/7)	100%(7/7)	100%(7/7)	100%(7/7)	71.4%(5/7)	42.9%(3/7)	28.6%(2/7)
	Class II	66.7%(2/3)	100%(3/3)	100%(3/3)	33.3%(1/3)	33.3%(1/3)	100%(3/3)	33.3%(1/3)

抗体が非特異反応以外には考えられない。

後者については、参加施設が使用したロット 13 と 14 には DR7 がコーティングされているビーズは 5 種類しかない。すなわち 5/30 だから陽性率はどんなに高くとも 17% 弱である。不一致となった 9 施設中明らかに機器設定に問題があると考えられたのは 3 施設で残りの 6 施設ははっきりと陽性ピークが認められるが陽性率の低さに躊躇されたようだ。これも添付文書にある “If the percent PRA is less than 10%, carefully examine the histogram.” に惑わされたのかもしれない。

以前赤座達也氏にヒストグラム合成ソフトウェアを作っていただいた。これは 1 種類のビーズが作るヒストグラムは正規分布曲線と同じであることから、30 の正規分布曲線を累計して一つのヒストグラムに

するエクセルマクロファイルである。抗体が陰性であれば、個々のビーズが作る正規分布曲線の中央値自体も正規分布に従った分散を示すはずであるから、合成されるヒストグラムも正規分布と似たものになる。ただし class I の場合は抗原の種類が class II よりはるかに多いため、それだけ分散した裾野の広いヒストグラムとなる。5つのビーズをずらして描いたのが図 2 である。実際の解析結果とほぼ同じである。極端な場合たった一つのビーズがシフトしてもそれは陽性である。その際の陽性率は 1/30 であるからわずかに 3% 強に過ぎない。

今回 FCS ファイルを提供していただき、取り込み Event 数についても比較することができた (HP 参照)。図 3 のようにこの解析担当者は「ピークにスパイクが見られたため、陰性とは判定できず」保留と

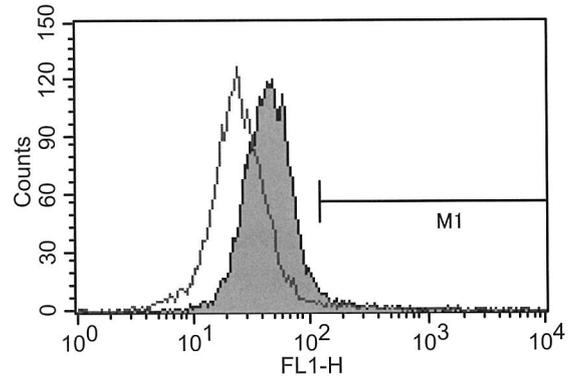
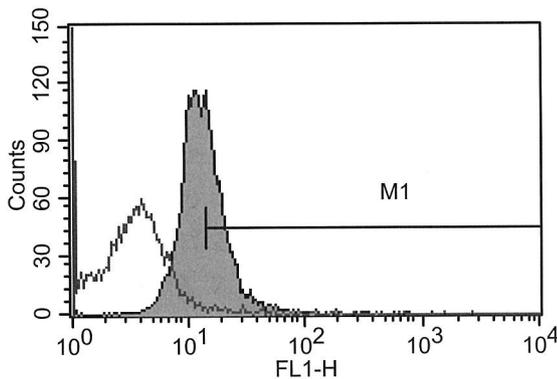


図 1 Amp gain の変更によるヒストグラムの違い

赤い外枠線のヒストグラムが negative control, 黒枠で内部が緑のヒストグラムが SH2003。

左が報告された結果, 右が Amp gain を強くして再測定した結果。

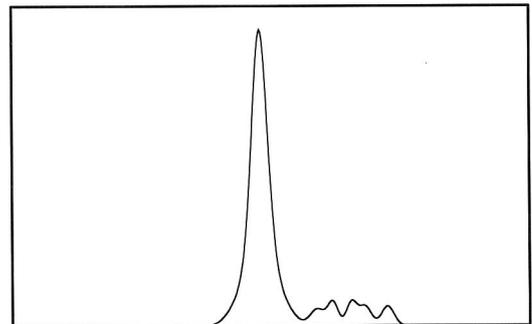
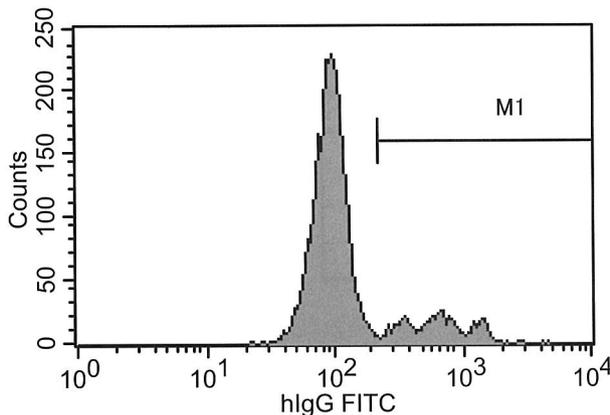


図 2 ヒストグラムのシュミレーション

左が SH2004 のヒストグラム, 右がヒストグラム合成ソフトウェアの結果。

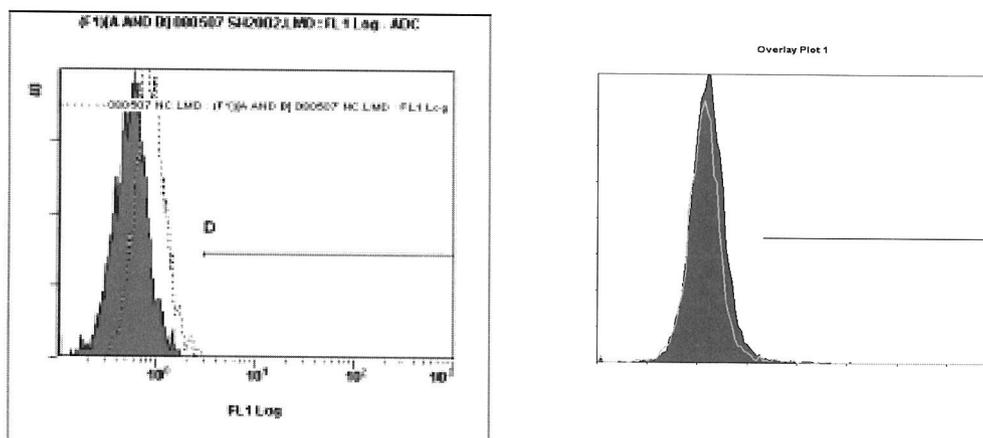


図3 Event数によるヒストグラムの違い
 左はEvent数4,500で判定は4(保留),
 右はEvent数29,000で判定は1(陰性)。

しているが、取り込みEvent数が少ないほどヒストグラムはスパイクピークが多くなることは当然である。多ければ多いほどいいというものではないが、これまでの例から見てEvent数10,000を超えればかなり滑らかなヒストグラムが得られるはずである。その点、添付文書に載っているヒストグラムはあまり良くない見本である。

FL-1 (FITC) と FL-2 (PE) の Compensation に関しては、SC ではよほどのことがない限り解析には支障はないが、FL-1 (FITC) の蛍光が多量に FL-2 (PE) に漏れ込む場合には、コントロールビーズの集団とかぶってしまい、gating が難しくなる場合がある。望ましいのは NC と PC のデータを gating 画面として使用する FSC×FL-2 (PE) のプロットで変化がないか比較することである。SA についても同様に NC と PC のデータを FL-1 (FITC)×FL-2 (PE) のプロットで比較するのが有用である。特に最も PE 蛍光の最も強いビーズと最も弱いビーズが影響を受けやすい (HP 参照)。これらのことについても残念ながら添付文書では触れられていない。

また、各施設から送付された FCS ファイルを解析して明らかとなったのは、BD と BC の機器では基本的な FSC×SSC のプロットが異なるということである (HP 参照)。BD では FSC で class I > class II となっているが、BC では逆である。これは BC の担当者によれば FSC (forward scatter) のフィルターの

違いによるということである。添付文書には BD のプロットしか掲載されておらず、機器の違いがプロットの違いにも影響する可能性があり、今後留意する必要があると考えられる。

5. まとめ

今回の検体は、FlowPRA 法の問題点を確認する上でもきわめて有用であったと考えられる。特に SH2003 に関しては、ヒストグラムがシフトした施設でコントロール血清として利用していただき、正しい機器設定等の条件を確立していただければ、Quality Control の役目を十分に果たしたことになる。

FlowPRA を扱うためには Flowcytometry にある程度習熟している必要があるが、添付文書を読む限りでは One Lambda 社が Flowcytometry に関して十分な知識を有しているとは残念ながら言い難いし、日本におけるディストリビューターであるベリタスも同様である。

幸いなことに BC は積極的に FlowPRA に取り組んでおり、サポート窓口としてメールでは cytometry@beckman.com、電話は 0120-826-777 を設けてユーザーからの問い合わせに対応している。BD は担当者が一昨年の学会に出席して、対応できる体制を検討するとのことであったが、残念ながらまだ進んではない。個々の担当者が対応してくれる場合もあるが、組織としてサポートする体制にはなっ

いない。当面は筆者が個別に BD ユーザーからの問い合わせに対応して行ければと考えている。

最後になるが FlowPRA や LABScreen で HLA 抗体を測定する上で、担当者が最も頭を悩ませるのはカットオフラインをどこに設定するかであろう。少なくとも現時点で言えるのは絶対的なラインは存在しないということである。臓器移植においては移植前の組織適合性検査と移植後のモニタリングでは尺度が異なる。輸血領域でも別な尺度が必要である。なぜなら血液センターが血小板抗体検査を依頼される

のはほとんどがランダム血小板不応性の患者血清だからである。そこでは臓器移植後と同様に抗体の吸着の可能性をどう判断するかが求められる。

それともう一つ。今回の QCWS には、A*2402 には反応しないが A*2403 には反応する検体が含まれていた。もうそろそろ血清学的 2 桁レベルから抗原としての 4 桁レベルに移行する時期に来ているのではないだろうか。アサインする側も臨床側も含めてであるが。

第 12 回 HLAQC ワークショップレポート (抗体部門) —LABScreen 法—

高陽 淑 (大阪府赤十字血液センター)

1. 抗体の有無の結果比較

今回 LABScreen 法の検討に参加したのは 11 施設で、そのうち 2 施設は抗体同定 (SH2005, SH2006) のみの参加であったが、9 施設は抗体の有無の結果 (SH2001~2004) についても回答していた。また、抗体スクリーニングの目的で用いた試薬の比較につ

いて第 11 回 QCWS を対象に調査したところ PRA を用いた施設の割合は減少し、Mixed を用いた割合が増加していた (図 1)。この現象の原因としては抗体の有無のみを求める検体は Mixed のみの測定結果で判定していた施設があったことと、Mixed が Lot.12 から MICA が測定可能になり、Lot.14 から

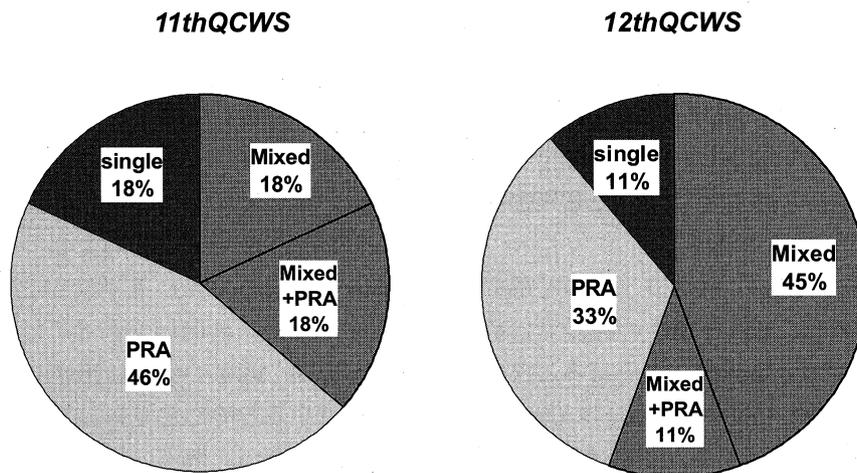


図 1 スクリーニングの目的で用いた試薬の比較

は beads 数が 17 種類 (class I が 12beads, class II が 5beads) に増加するなど改良されてきたことが考えられた。次に抗体の有無の結果を比較するとクラス I では SH2002~2004 について、クラス II では SH2005 についての結果が 100% 一致にはならなかった。その原因はスクリーニングの検査として用いる試薬によって違いがある。Mixed を用いた場合では Cut off Ratio の設定や判定後の再検の有無が、single antigen を用いた場合では試薬のロット間差が反映していると考えられた (各試薬の反応性比較に関するデータはホームページ掲載の図表を参照)。

2. 施設間での判定結果比較

SH2005, SH2006 の検体について、抗原別反応値の一覧表に記載のある A~C ローカスまでの 81 種類の HLA 抗原に対する判定スコアを比較したところ施設間の判定が一致していた抗原は両方の検体ともに 90% 程度で、残りの 10% は陽性と陰性の判定が混在していた。そこで結果が不一致であった抗原について single antigen を実施した 10 施設の測定値 (BNV) および判定結果の比較を行った。その結果、判定結果が不一致の原因としては、single antigen のロット間差、反応性および判定基準の施設間差などが考えられた (詳細なデータはホームページ掲載の図表を参照)。

3. 施設間での反応条件の比較

同一検体で同一ロットの試薬を用いた測定での BNV 値に施設間差がみられたことから Control bead の Raw data について施設間で比較を行ったところ、図 2 に示すとおり非常にバラツキがあることが判明した。そこで、その原因を調べるために各施設の反応条件 (前処理, サンプル量, 反応の温度・状態・時間, 洗浄) についてアンケート調査を実施した (表 1)。施設間で大きな違いは見られなかったことから、洗浄後のフリッキングの具合, 二次抗体 (PE-IgG) の保存管理状態, Luminex のメンテナンスなど、今回のアンケート調査では明らかに出来なかった点に要因があると推測された。

4. 参加施設によるグループ解析と各施設の判定基準

各施設が提出したデータから得られた大まかなまとめを参加施設にメール配信し、自施設と他施設の判定結果が一致していないデータの見直しおよび、その原因について各施設での考察を依頼した。また、同時に各施設の判定基準についてもアンケート調査を実施した (回答の詳細についてはホームページ掲載のまとめを参照)。アンケート調査の結果から陽性判定の基準を大別すると、以下に示す 2 種類のパターンに分類できるようであった。

① BNV 値が 1,000 前後を示した beads の判定か

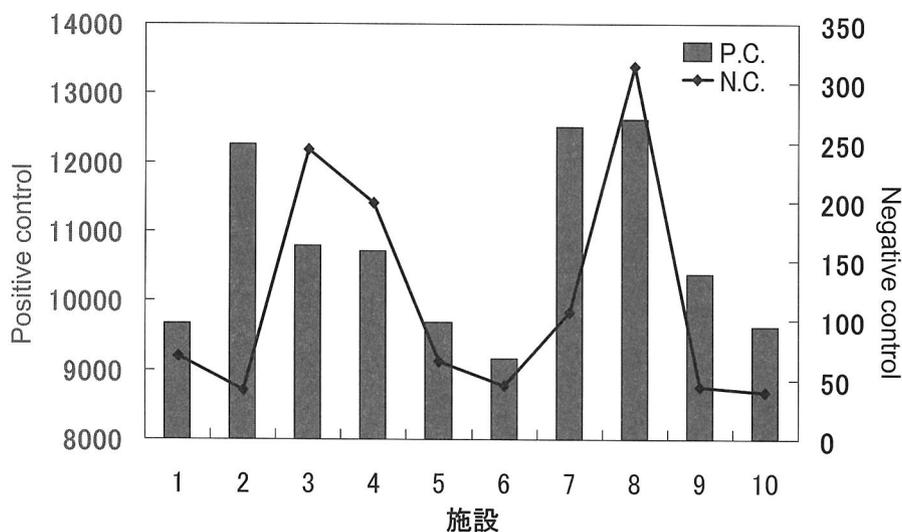


図 2 control bead の反応性比較 (クラス I: SH2006)

表 1 反応条件のまとめ

		最多回答	回答の範囲
前処理	回転数	10,000rpm	13,000～15,000rpm
	時間	10分	3～60分
反応量	検体	20 μ L	5～20 μ L
	Beads	5 μ L	1.25～5 μ L
反応	形態	プレート	2施設はチューブ
	温度	25 $^{\circ}$ C	18～25 $^{\circ}$ C
	状態	ミキシングしながら反応	シェーカーあるいはVoltexを使用
	時間	一次・二次反応ともに30分(全施設一致)	
一次後 洗浄	回数	3回	1施設のみ4回
	液量	1回目150 μ L、2,3回目200 μ L	100～200 μ L(1施設は1,000)
二次後 洗浄	回数	2回	1～3回
	液量	200 μ L	100～200 μ L(1施設は1,000)

ら明確な抗体特異性が検出できること。

② 解析プログラム (HLA Visual) の自動判定結果。

ただ、いずれの基準であっても HLA 抗原の交差反応性や抗原の出現頻度など結果の解釈に必要な知識やリファレンスデータの蓄積が必要であると思われる。

5. 今後の課題

参加施設による解析から導かれた今後の課題として、次の2点が挙げられる。

① アッセイにおける技術の向上

具体的には、同一ロットによる同一検体の BNV 値には大きな施設間差がないこと、さらに HLA に関する知識と各施設でのデータ蓄積を行い正確に判定結

果の解釈を行うこと。

② 判定基準の統一化

具体的には、検査の目的(移植か輸血か、など)によっても違いはあるものの最低限の基準は統一化するべきであるということ。

6. 次回の QCWS に関する提案

① LABScreen での判定基準を明確にした上で Flow PRA 等の他法との比較を行う。

② 判定済みの CSV を他施設で再度判定し、その結果を比較し合う。

③ 施設の事情(輸血関連か移植関連かなど)を考慮した解析を行う。