

# 第14回 HLA-QC ワークショップレポート

## 第14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, 中島文明 (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#

#: 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<sup>1)</sup>, 太田正穂<sup>2)</sup>, 木村彰方<sup>3)</sup>, 高陽淑<sup>4)</sup>, 佐田正晴<sup>5)</sup>, 佐藤 壯<sup>6)</sup>, 中島文明<sup>1)</sup>, 成瀬妙子<sup>3)</sup>, 橋口裕樹<sup>7)</sup>, 宮崎 孔<sup>8)</sup>, 森島泰雄<sup>9)</sup>, 安波道郎<sup>10)</sup>, 山本 賢<sup>11)</sup>  
(所属: <sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液研究所, <sup>2)</sup>信州大学医学部, <sup>3)</sup>東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, <sup>4)</sup>大阪府赤十字血液センター, <sup>5)</sup>国立循環器病センター再生医療部, <sup>6)</sup>札幌北榆病院臨床検査課, <sup>7)</sup>福岡赤十字病院, <sup>8)</sup>北海道赤十字血液センター, <sup>9)</sup>愛知県がんセンター中央病院・血液細胞療法部, <sup>10)</sup>長崎大学熱帯医学研究所, <sup>11)</sup>国立循環器病センター臨床検査部)

### 1. ワークショップの経過

平成 22 年 2 月から今年度の方針について QCWS 部会で討議を行い, DNA-QC 及び抗体 QC に用いる試料の選択を行った。また, 昨年度から行っている臨床部門別での解析を今年度も実施することとし, 参加申込の際に ① 輸血, ② 臓器移植, ③ 造血幹細胞移植, ④ その他 (研究等) の 4 部門における QCWS の結果解析を行うこととした。

平成 22 年 1 月から QCWS 開催及び参加申込みの案内を学会誌及びホームページ (以下, HP) に掲載し, 平成 22 年 3 月 12 日までに 69 施設 (集会のみ参加を含む), 181 名から参加申し込みがあった (平成 21 年度: 68 施設, 172 名)。4 月 7 日に試料を, 4 月 20 日に結果入力用シートを CD にて配布し, 結果提出締切りを 5 月 28 日とした。参加者との連絡及びデータ収集は, 各施設の連絡者を通じ, 電子メールで行った。

最終的に, 63 施設 (DNA-QC: 58 施設, 抗体 QC: 41 施設) からデータ提出があり, 生データ及び取りまとめた結果を各解析担当者に送付し, 8 月下旬まで解析を行った。解析結果は, 例年のどおり学会 HP

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 のテーマ及び試料選択について

DNA-QC のテーマを ① 正確な DNA タイピング出来ること, ② DNA タイピング結果が正しく表記されていること, ③ 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の 3 点とした。また, 試料については, 前年度 QCWS 部会で協議した「日本人由来の細胞で, ある程度高頻度で見られる HLA アリルであること」, 「HLA-B\*15 及び B\*40 アリルを含む検体であること」の要件に合う細胞を 4 種類購入し抽出した DNA を配布することとした。

抗体 QC のテーマは, 昨年同様, 通常検査で検出される抗体で ① 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, ② 非特異成分 (反応) の排除が適切に行なえること, ③ HLA-C 座抗原に対する抗体特異性が検出可能であることとし, 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, ① IgG と IgM の HLA 抗体が含まれること, ② HLA 以外に MIC 抗体の特異性を含むことも試料選

択の要件とした。交差適合試験については、アンケート調査で細胞も準備して欲しいとの希望もあったが、対応が困難なため、配布検体の一部を使った任意参加によるデータ収集を行い、クロスマッチ試験の現状把握を行った。

### 3. 参加者数及び参加施設

参加者数は209名(事前参加:181名, QCWS集会当日参加:28名), 参加施設数は69施設(集会のみ参加を含む)であった(表1)。

### 4. 解析方法

検査法別解析は, DNA-QCでは①SSO法(Luminex), ②SSP法及びSSO法(Luminexを除く), ③SBT法について, 抗体QCでは, ①LABScreen, ②WAKFlow・ICFA, ③FlowPRA, ④LIFT(抗体)の4法について解析を行った。部門別解析は, 昨年, 各参加部門(輸血・臓器移植・造血幹細胞)で同様の解析を行い, 結果報告を行ったため, 報告内容が重複していた。今年度は, DNA-QCと抗体QCでの部門別の検査状況と問題点について解析し, 施設別結果の評価を併せて行った(結果評価については, 「HLA-QCワークショップ結果評価の基準」参照)。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) DNA-QC

- ① Luminex (SSO) 法について: 石井博之(大阪府血液センター)
- ② SBT法について: 吉川枝里(東海大学医学部)
- ③ DNA検査法解析(Luminex, SBT以外): 橋口裕樹(福岡赤十字病院)

#### 2) 抗体QC

- ① Flow PRA法の検査状況の解析: 佐藤 壯(札幌北楡病院)
- ② LIFT法およびFCXMの検査状況の解析: 宮崎 孔(北海道血液センター)
- ③ Lab Screenによる抗体検査: 高 陽淑(大阪府血液センター)
- ④ WAK Flow および ICFA 法による抗体検査: 関根みゆき(東京都血液センター)

#### 3) 部門別解析

- ① DNA-QC(表記法含む): 田中秀則(中央血液研究所)
- ② 抗体QC: 中島文明(中央血液研究所)

### 5. QCWS サンプルの総合結果

各施設の精度管理, 技術訓練に役立つよう, 本ワークショップで解析されたデータに中央血液研究所で精査した結果を合わせ, DNAおよび抗体試料の総合結果を示す。

DNA-QCの試料は, SBTデータを基準にSSOなど他法の結果を参考に総合的にリアサインを行った。HLA-A, B, C, DRB1でAmbiguityとなるアリルが存在する場合, 1本鎖DNAに調製することにより塩基配列を確定しAmbiguityを回避した結果を示す。解析解像度は, IMGT/HLA Database Sequence Alignments based on Release 3.0.0 (Apr-2010), 表記は本学会HLA標準化委員会の表記ルール(2003年度版)に則り記載した(表2)。また, 抗体QCの試料は, LABScreen Single Antigen試薬の結果を基準として検査方法別に各抗原に対する反応状態を簡略化して示した(表3)。

表 1. 第 14 回 QCWS 参加施設

(受付日付順)

1	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部	36	山形県立 中央病院	輸血部
2	富山大学附属病院	輸血・細胞治療部	37	県立広島病院	臨床研究検査科
3	公立大学法人 横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部	38	北海道赤十字血液センター	検査部 検査三課
4	医療法人 立川メディカルセンター 立川総合病院	臨床検査科	39	財団法人 鷹揚郷腎研究所	化学実験室
5	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	40	広島大学病院	輸血部
6	日本赤十字社 中央血液研究所	研究開発部	41	長野赤十字病院	臨床検査科
7	香川県立中央病院	中央検査部	42	大阪府赤十字血液センター	検査部 検査三課
8	姫路赤十字病院	検査部	43	名古屋第二赤十字病院	医療技術部 組織適合検査室
9	広島県赤十字血液センター	製剤課	44	株式会社エスアールエル	臨床検査事業品質保証部 品質保証企画グループ
10	NPO法人腎泌尿器疾患研究所		45	国立病院機構千葉東病院	研究検査科
11	大阪府立急性期・総合医療センター	組織適合性検査室	46	東海大学医学部付属病院	診療技術部 移植免疫
12	新潟市市民病院	臨床検査科 輸血室	47	九州大学病院	遺伝子・細胞療法部
13	広島県赤十字血液センター	技術部 検査課	48	株式会社 ベリタス	技術営業部
14	北里大学病院	臨床検査部 DNA検査室	49	三菱化学メディエンス株式会社	遺伝子検査部 細胞性免疫グループ
15	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部	50	東京女子医科大学	腎センター移植免疫研究室
16	関西医科大学附属病院	輸血部	51	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部
17	日本赤十字社 九州血液センター	検査二課	52	東京都赤十字血液センター	検査部 検査三課
18	徳島大学病院	輸血部	53	山形県立 救命救急センター	輸血部内 山形県移植検査センター
19	北海道大学病院	検査・輸血部	54	岡山県赤十字血液センター	検査課
20	近畿大学医学部附属病院	輸血部	55	虎の門病院	輸血部
21	獨協医科大学病院	臨床検査部	56	熊本大学医学部附属病院	中央検査部
22	三重県赤十字血液センター	学術課	57	愛知県赤十字血液センター	検査二課
23	仙台社会保険病院	検査部	58	岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部
24	高知医療センター	MCM検査室 HLA検査	59	宮城県赤十字血液センター	技術部検査一課
25	大分県立病院	輸血部	60	筑波大学	医学系技術室
26	株式会社ビー・エム・エル	特殊分析部 ゲノム検査2課	61	株式会社 保健科学研究所	特殊分析センター 染色体遺伝子関連・細胞検査グループ
27	福岡赤十字病院	検査部 HLA検査室	62	社会保険中京病院	検査部
28	静岡県立総合病院	輸血・細胞治療室	63	株式会社 リプロセル	FCM・検査部門
29	札幌北楡病院	臨床検査科	64	国立循環器病センター	臨床検査部 輸血管理室
30	岐阜大学病院	検査部	65	東海大学	医学部基礎医学系分子生命科学
31	湧永製薬株式会社	バイオ事業開発部	66	特定非営利活動法人 HLA 研究所	
32	佐賀県唐津保健福祉事務所	検査室	67	株式会社 医学生物学研究所	応用技術部
33	岐阜赤十字病院	検査部 検査課	68	東京大学医学部附属病院	輸血部
34	金沢医科大学病院	北陸腎移植HLA検査センター	69	東海大学医学部	教育研究支援センター
35	山田赤十字	輸血検査室			

表 2. HLA specificity of the 14th. QCWS DNA samples

ID	HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1	
H2201	A*02:06:01	A*02:07	B*46:01:01	B*59:01	C*01:02:01	-	DRB1*04:05:01	DRB1*08:03:02
	<b>A2</b>	<b>A2</b>	<b>B46</b>	<b>B59</b>	<b>Cw1</b>	-	<b>DR4</b>	<b>DR8</b>
H2202	A*24:02:01:01	-	B*15:01:01:01	B*15:18:01	C*01:02:01	C*07:04:01	DRB1*08:02:01	DRB1*14:05:01
	<b>A24</b>	-	<b>B62</b>	<b>B71</b>	<b>Cw1</b>	<b>Cw7</b>	<b>DR8</b>	<b>DR14</b>
H2203	A*11:01:01	A*31:01:02	B*40:02:01	B*40:06:01:01	C*03:04:01:01	C*08:01:01	DRB1*04:05:01	DRB1*04:10
	<b>A11</b>	<b>A31</b>	<b>B61</b>	<b>B61</b>	<b>Cw10</b>	<b>Cw8</b>	<b>DR4</b>	<b>DR4</b>
H2204	A*11:01:01	A*24:02:01:01	B*15:01:01:01	B*51:01:01	C*04:01:01:01	C*14:02:01	DRB1*04:06:01	DRB1*14:03:01
	<b>A11</b>	<b>A24</b>	<b>B62</b>	<b>B51</b>	<b>Cw4</b>	-	<b>DR4</b>	<b>DR1403</b>

ID	HLA-DRB345		HLA-DQA1		HLA-DQB1		HLA-DPB1	
H2201	DRB4*01:03:01:01	-	DQA1*03:01:02/03	DQA1*01:03	DQB1*04:01:01	DQB1*06:01:01	DPB1*02:01:02	DPB1*04:02/105:01
	<b>DR53</b>	-	nd	nd	<b>DQ4</b>	<b>DQ6</b>	<b>DPw2</b>	nd
H2202	DRB3*02:02:01	-	DQA1*03:01:02/03	DQA1*01:01/04/05	DQB1*03:02:01	DQB1*05:03:01	DPB1*05:01:01	DPB1*04:02/105:01
	<b>DR52</b>	-	nd	nd	<b>DQ8</b>	<b>DQ5</b>	<b>DPw5</b>	nd
H2203	DRB4*01:03:01:01	-	DQA1*03:02/03	-	DQB1*04:01:01	DQB1*04:02	DPB1*02:01:02	DPB1*04:02/105:01
	<b>DR53</b>	-	nd	nd	<b>DQ4</b>	<b>DQ4</b>	<b>DPw2</b>	nd
H2204	DRB3*01:01:02	DRB4*01:03:01:01	DQA1*05:03/07	DQA1*03:01	DQB1*03:01:01	DQB1*03:02	DPB1*02:01//+	DPB1*05:01//+
	<b>DR52</b>	<b>DR53</b>	nd	nd	<b>DQ7</b>	<b>DQ8</b>	nd	nd

Upper (Italic): Allele type  
Lower (Bold): HLA type

nd: No assignment



- ・Luminex 法の結果表記
- ・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
- ・アサインミス
- ・各施設のカットオフ値の変更状況

なお、詳細なデータについては、学会ホームページに掲載の「14回 QC ワークショップ報告集」を参照されたい。

### 3. 結果と考察

#### 3.1. Luminex 法の結果表記

結果の表記法については、多数の施設で不備が見られた。特に、多く見られたのは、Null allele の表記 (N) である。その他、“\*”マークの記入漏れ等、以前より指摘のあった不備も多く、さらなる確認が必要である。また今回の QCWS から新しい表記法での報告であったが、ローカス名 (Cw → C)、アリル名 (DPB1) が旧表記の施設も見られた。

#### 3.2. コントロールビーズ蛍光値の平均値とばらつき (%CV)

各施設の陽性及び陰性コントロールビーズ蛍光値の平均値 (4 検体分) 及びばらつき (%CV) を求め、施設間 (キット及びローカス別) で比較した。特に陽性コントロールビーズ蛍光値のばらつき (%CV) が大きい施設やクラス I キットにおける Exon2, 3 の増幅バランス (WAKFlow では、各エクソンの sense, anti-sense の増幅バランス) が悪い施設は、PCR の状態が良好でないことが考えられる。

#### 3.3. 各プローブの Pmin/Nmax 値の比較

Pmin/Nmax 値は、各プローブにおける蛍光値の陽性最小値 (Pmin) と陰性最値 (Nmax) の比率で、比率が大きいほど陰性・陽性の区別が明瞭となり良好と考えられる。Pmin/Nmax 値を 4 種類 (3 未満, 3 以上 10 未満, 10 以上 50 未満, 50 以上) に分類し、その割合を施設間 (キット及びローカス別) で比較した。各施設共通して Pmin/Nmax 値の低いプローブについては、もともと性能の低いプローブと考えら

れるが、他施設と比較して、3 未満または 3 以上 10 未満の Pmin/Nmax 値の割合が多い施設は、技術的なことも含むタイピング環境の見直しが必要と考えられる。

#### 3.4. アサインミス

Luminex 法におけるアサインミスは 6 件 (HLA-B: 1 件, HLA-C: 2 件, HLA-DRB1: 1 件, HLA-DQB1: 1 件, HLA-DPB1: 1 件) あった。その内 2 件は、転記ミスと考えられ、データ自体に問題は見られなかった。他の 4 件については、1 つのプローブの反応が false positive によるものが 2 件、false negative によるものが 2 件あった。この 4 件の内 2 件については同一施設の HLA-C であったが、全体的に反応性が悪く、判定が困難であり、再検査等の必要性があったのではないかと考える。他の 2 件についても、判定の段階で各プローブの反応性を丁寧に確認していけば防げたミスである。

#### 3.5. 各施設のカットオフ値の変更状況

各施設の判定結果をもとに、カットオフ値 (メーカー指定の値を基準とした) の変更状況を確認した。7 施設においては、タイピング実施ローカスすべてカットオフ値の変更なく正しい結果をアサインしていた。もっとも多い施設では、1 つのローカスの判定において、9 個のプローブのカットオフ値を変更しており、全体的に反応性が悪いことがうかがえる。メーカーのカットオフ値はあくまで参考値であり、カットオフ値の変更を余儀なくされる場合もあるが、その値が大きく外れる場合や多数のプローブのカットオフ値を変更する場合は、やはり注意が必要である。

### 4. まとめ

各参加施設のデータを比較では、概ね良好であったが、一部の施設で PCR の増幅不良およびプローブとの反応性が悪い等の反応データでの不備が見られた。このような場合、HLA タイプの判定が困難となり、アサインミスの原因になる。参加各施設では、他の施設のデータと比較していただき、問題点を改善することが望まれる。

# 第14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—

吉川 枝里

東海大学医学部

## 1. はじめに

今回のQCWSでSBT法の参加施設は全6施設で、昨年より3施設減少した。全ての施設がSBT以外の2法以上を併用し、使用されたキットはAllele SEQR (abbott)のみであった。これまで販売されてきたAllele SEQR DRB1キット (abbott)は、第2エクソン配列の一部を対象としていたが、新たにプライマーが改良され、以前よりも広い範囲の第2エクソン配列を対象としたタイピングが可能なキットが販売された。今回のQCWSにおいて、この2種のキットが使用されたため、施設によってDRB1の結果に違いが生じたが、どちらのキットの結果も正解とした。

## 2. 解析結果と考察 (HP 掲載結果: 表 2, 3)

### 1) 表記法における不正解

今回以下の3例で表記ミスが認められた。

- (1) H2204のHLA-Aと-DQB1およびH2202のHLA-Bにおいて、代表的な候補のみを結果入力枠に記載し、他の候補をコメント欄に記載した施設があった。複数の候補が得られた場合は、スラッシュ (/) を入れ判別出来ない他の候補も枠内に記載することが原則である。
- (2) H2204のHLA-Bは、第1区域で絞り込めない組み合わせが複数存在するアンビグイティーのため、HLA-B\*15:01//+, HLA-B\*51:01//+が正解となる。1施設のみがHLA-B\*15:01/04/08/+, HLA-B\*51:01//+と記載し、不正解となった。
- (3) HLA-DPB1のH2201, 02, 03は、第1区域

で絞り込めない候補が複数存在するアンビグイティーとなる。(2)の組み合わせによるアンビグイティーとは異なり片側の枠のみのアンビグイティーであるため、HLA-DPB1\*04:02/105:01, HLA-DPB1\*05:01と記載するのが正解となる。1施設が、HLA-DPB1\*04:02//+, HLA-DPB1\*05:01と記載し不正解となった。

### 2) 候補アリの絞り込みにおける不正解

誤った絞り込みを行った施設が1施設あった。この施設は、第2, 3, 4エクソンの塩基配列全てが一致したアリのみを候補としていたため、H2202のHLA-B, H2204のHLA-Aおよび-C, において、IMGTデータベース上に第4エクソンの配列情報が登録されていないアリの候補から削除していた。しかし、配列情報がないという理由だけでは可能性を否定できず、候補から除外することは出来ないため不正解となった。

### 3) リファレンスの更新

キット販売会社から提供される解析ソフトのための判定用パターンファイル(リファレンス)は定期的(3~4ヶ月に一度)に更新されている。登録アリの数は年々増加しているため、リファレンスによって判定結果が異なる。よって、解析する際は、最新のリファレンスをダウンロードし最新の情報による判定を行う必要がある。今年のQCWSで用いられるべき最新のリファレンスは、Assign 3.5™ソフトではIMGT/HLA 15/01/2010, Assign 3.5+™ソフトではIMGT/HLA 01/04/2010となる。どちらのリファレンスを用いても同様の結果が得られたため、その

結果を正解とした (HP 掲載結果: 表 1)。解析の結果, 6 施設中 4 施設がリファレンスの更新を行っていないことが明らかになった。最新のリファレンスを使用していない場合は, タイピングを行う環境が整っていないと判断されるため, 不正解と判定した。

### 3. まとめ

毎年, 不正解の主な原因として挙げられる表記法

のミスタイプは, アンビギュイティーにおける表記ミスがほとんどである。6桁以上のタイピングが可能な高精度タイピング法である SBT 法においては, 特に注意すべき点である。また今年議題となったリファレンスの更新は, 年々増加する新規アレル情報のみでなく, 既知アレルの新たな配列情報を得るなど, 最新の情報をもとにタイピングを行うためには, 必要な作業である。

## 第 14 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, SSP 法—

橋口 裕樹

福岡赤十字病院検査部 HLA

### 1. 参加施設

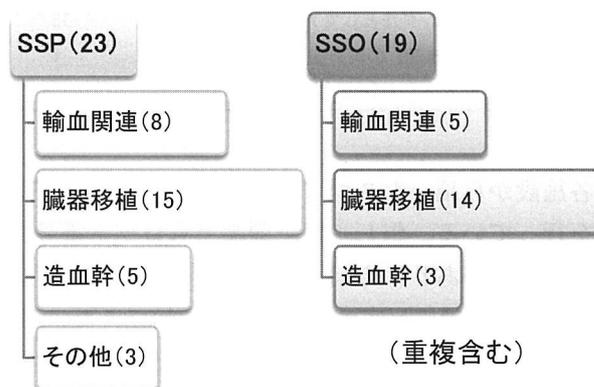
14thDNA-QC 参加数は, 昨年同様に 58 施設で

表 1 使用方法の内訳

方法	(n)	(%)
SSP	23	39.7
SSO	19	32.8
Other	16	27.5
参加施設	58	

あった。参加施設の方法及び部門内訳は, 下記に示す通りである (表 1, 表 2)

表 2 参加施設の部門内訳



## 2. SSP 法

SSP 法は試薬キットが多数発売されており、その多くは One Lambda 社 Micro SSP であり、他に in-vitrogen UniTray, 自家製を使用した施設も数施設あった(表 3)。

表 3 キット構成及びローカス別の使用数 (#2201-2204 の合計数)

商 品 名	A	B	C	DR	DQ	DP
Micro SSP JPN	45	45	45	45	45	0
Micro SSP ABDR	8	8	0	8	8	0
Micro SSP 1L/2L	4	4	4	4	4	0
Micro SSP specific	11	12	11	16	9	0
UniTray	6	3	4	0	0	4
All set Gold	0	0	1	5	2	3
自家製	0	0	0	4	0	0
Total	74	72	65	78	68	7

また SSP 法の使用目的では、主なタイピング法として使用する以外に、他法との併用及び一部の HLA 座の確認用として補助的に使用している施設もあった(表 4)。

表 4 使用目的

目的	施設数
SSP 法を主なタイピング法としてアレル判定に使用	13
SSP 法, 他法 (SSO 法等) の両方をアレル判定に使用	6
SSP 法を補助としてアレル判定に使用	4

各施設から頂いたスコアデータは製品別に並び替えを行っている。但し、同一製品でもロット番号が異なるものがあり、今回各ロット評価までには至っていない。単純に反応の強弱だけで比較できないが、データを比較すると疑陽性 (False positive), 疑陰性 (False negative) と思われる反応が散見している。これが原因で正解アレルを含まないアレル表記, HLA 型の判定ミス, 判定保留になる可能性もある。各施設にて自施設が使用している製品のスコアデータを他施設と比較して頂きたい。

## 3. SSO 法

SSO 法の中で 19 施設が invtrogen (Dynal) RELI を使用した。ローカス別の参加施設数は下記に示した通りである(表 5)。

表 5 ローカス別参加施設数 (#2201-#22004)

A	B	C	DR	DRB3, 4, 5	DQ
19/19	19/19	6/19	19/19	16/19	3/19

## 4. キット構成

各施設の多くはロットの異なる試薬キットを使用している状況であった(表 6)。比較的、短期間でロット変更が行われる RELI は、各施設にて解析ソフトのバージョンアップ, ロット変更など、管理を確実に行う必要がある。

また、キット添付書類に疑陽性 (False positive), 疑陰性 (False negative) が発生しやすいプローブ情報が掲載されてあるので、使用しているキットの特徴を確認しておく必要があると思われる。全体的に反応性が弱い施設も散見され、反応条件 (ハイブリ温度) の確認を行う必要がある。

表 6 試薬キットの内訳

	A	B	B	C	DR	DQ
使用施設数	19	16	3	6	19	3
キットプローブ数	48	62	113	37	54	41
ロット種類	13	10	2	4	13	2

## 5. 結果報告

今年より命名規則の変更に伴い、新規則でのアレル表記となった。詳細は、学会ホームページを参考にしたい。数施設において記載不備が今回も見受けられた。また、アレル表記の記載がない施設 (22D48), HLA 型の記載がない施設 (22D29) もあり、減点の対象とした(表 7)。

表7 ミスアサイン / 施設別

Sample	Lab. No	方法	結果		正解	
			アレル表記	HLA 型	アレル表記	HLA 型
#2201	22D33	SSO	<u>C*01:16</u>	Cw*1	C*01:02	Cw1
#2201	22D20	SSP	-	-	DQB1*06:01	DQ6
#2202	22D33	SSO	<u>A*24:88</u>	A24	A*24:02	A24
#2202	22D19	SSO	<u>C*01:01/06/07/+</u>	Cw1	Cw*0102	Cw1
#2202	22D18	SSO	<u>DRB1*08:09/21</u>	DR8	DRB1*0802	DR8
#2202	22D29	SSO	-		DRB1*0802	DR8
#2203	22D50	SSO	<u>B*40:19</u>	B61	B*4002	B61
#2203	22D44	SSO	<u>C*03:10/29</u>	Cw3	Cw*0304	Cw10
#2203	22D47	SSP	C*08:01/02/03/+	<u>Cw6</u>	Cw*0801	Cw8
#2203	22D19	SSO	<u>DRB1*04:03</u>	DR4	DRB1*04:05, 04:10	DR4
#2203	22D29	SSO	<u>DRB1*04:05/08/11/+</u>		DRB1*04:05, 04:10	DR4
#2204	22D50	SSO	<u>A*11:23/24</u>	A11	A*1101	A11
#2204	22D29	SSO	<u>B*35//+</u>		B*5101	B51
#2204	22D50	SSO	<u>B*35:43/67/79</u>	B35	B*5101	B51
#2204	22D50	SSO	<u>B*52:01/09</u>	B52	B*1501	B62
#2204	22D50	SSO	<u>DRB1*04:07/20/47/+</u>	DR4	DRB1*0406	DR4
#2204	22D29	SSO	<u>DRB1*03:02/27</u>		DRB1*1403	DR14
#2204	22D29	SSO	<u>DRB1*04:58</u>		DRB1*0406	DR4

## 6. サンプル DNA

今回より、SSP用にDNA量を200  $\mu$ Lに増量した検体配布の配布が行われた。結果として、SSPを使用している施設は例年より量的に検査し易かったと思われる。RELIの施設では、配布された濃度では

濃く、5倍程度に希釈して使用しなければならなかったと思われる。使用試薬応じて必要なDNA量および濃度があることはよく知られている。この条件を把握し使用する必要がある(表8)。

表8 配布サンプルDNA(#2201-#2204)と、主な試薬キットの必要DNA濃度及び量

キット名	配布資料 a	配布資料 b	SSP (MicroSSP-JPN)	SSO (RELI)
DNA 濃度	100ng/ $\mu$ L	100ng/ $\mu$ L	100ng/ $\mu$ L (25-200)	13-15ng/ $\mu$ L
配布量	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	111 $\mu$ L/test	15 $\mu$ L/locus

# 第14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—

佐藤 壯

札幌北楡病院

## 1. はじめに

3年連続で FlowPRA 解析を担当することになった。データ提出用ファイルに添付される histogram は各施設でそのスケールや表示方法が統一されていないため、昨年からのデータ提出時に FCS ファイル (LABScreen 法における CSV ファイルと同様のファイル) の提出をお願いしている。

今年は各施設のご協力もあり全施設からファイルをお送りいただけたので、それらの FCS ファイルを FCS ファイル解析ソフトウェア FlowJo (Tree Star, USA) で解析し、統一的なスタイルで表示・比較することが可能となった。

レポート図表や集計結果は、学会ホームページの QCWS から「第14回 QCWS 解析報告集」([http://square.umin.ac.jp/JSHI/qcws/14QCWS/13qc\\_report.html](http://square.umin.ac.jp/JSHI/qcws/14QCWS/13qc_report.html)) の「FlowPRA 法の検査状況の解析」(14 QC\_Ab\_FlowPRA\_2.pdf) を参照していただきたい。この本文では図表が掲載されているページ数のみを表示する。

## 2. 参加施設と測定項目・機器

昨年までは参加施設を医療機関、血液センター、検査センターに区分して表示していたが、施設名が特定される可能性もあることから今年は参加部門、測定項目のみを2ページに表示している。同様の理由から FCM についてもメーカー名のみを表示している。今年の参加施設は合計23施設(前年比3増)で、区分としては医療機関が15施設(4増)、血液センター6施設(1減)、検査センター2施設(増減なし)であった。

Screening Test (以下 SC) は全施設が測定し、この

うち class I 抗体のみ測定が3施設だった。なお、22S30 施設は class II 抗体測定を IgG+IgM 抗体で測定しているために class II 抗体に関しては今回の解析対象から除外している。IgM 抗体を測定したのは6施設(増減なし)、Single Antigen (以下 SA) を測定したのは6施設(3減)であった。

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11施設だった。

## 3. 測定結果

### 1) SC

今回の配布検体は4種類で、IgG class I 抗体はすべての検体、IgG class II 抗体は SH2202, SH2204 で陽性だった。陽性検体を8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5, 6ページである。histogram は7~20ページで生データと FlowJo 変換データを交互に示した(class II の SH2201 と SH2203 は生データのみ)。結果が一致していなかったのは class I 抗体の SH2204 で3施設、class II 抗体の SH2201 で1施設、SH2204 で7施設だった。class II 抗体の SH2201 で4と判定した施設に確認したところ、再検して陰性だったので修正した結果を送付したが締め切りを過ぎていたため変更が認められなかったということで、実質的に判定が一致していなかったのは SH2204 検体のみであった。

IgM 抗体は class I 抗体が SH2201, SH2202, SH2203 で、class II 抗体は SH2202, SH2203 で陽性だった。25ページの結果、26, 27ページの histogram を参照していただきたいが、class I 抗体のほうが class II 抗体と比較して不一致率が高かった。

## 2) SA

測定した6施設中1施設がclass II抗体のみを測定している。ほとんどの施設がG1~4のみを測定していた(判定スコアは30~32ページ, plotは33~40ページ)。2施設においてPE蛍光の最も弱いピーズが陽性となった際に上にずれるか下にずれてplot上から消失する場合があります, Compensation不良のプロットが認められた。

1施設で最終結果の記入が検体間で入れ違っており(29ページ), それを修正するとおおむね各施設同様の結果が得られていた。

## 4. 考察

今回議論の対象となるのはSH2204検体についてである。

SH2204検体のIgG class I抗体に関して4と判定したのが1施設, 1と判定したのが2施設であった。また, IgG class II抗体については4と判定したのが1施設, 1と判定したのが6施設で, class I抗体の3施設と重複していた。4, 1と判定した7施設は, BD使用施設が3, BC使用施設が4であった(20ページ)。各施設のhistogramをより強い陽性ピークが得られる順番に並び替えたのが21ページで, 10施設で明らかな陽性ピークが認められない(3施設は右肩の膨らみ方で陽性と判定している)一方で3施設ではサードピークが認められた。

7施設について詳細に検討したところ, SH2204のclass I抗体についても明確なマルチプルピークが得られていないことがわかった(22ページ)。SH2204検体は他の検体と比較して, class I抗体, class II抗体共に陽性ピークの蛍光強度がそれほど強くなく機器設定の善し悪し(Compファイル等)がより強く影響したのかもしれない。機器別に見るとBDの1施設はhistogramが左端に貼り付いて明らかにCompensation不良と思われるので改善をお願いしている。1施設は今年から参加した施設で初期設定に問題があり7月に設定を変更して改善が認められている(23ページ)。残る1施設も流路系の洗浄により改善されている(24ページ)。BCの4施設は多くがEpics

を使用している施設で一部設定条件の変更で改善が認められるものの(23ページ), 他のEpics使用施設でもhistogramの形状にクリアさがいささか欠ける傾向が見受けられた。Epicsの場合条件設定がやや難しい可能性があり, これについてはBCの担当者にも結果を伝えて機器設定の変更について検討を依頼している。

昨年は試薬の劣化が関係している可能性を指摘したが, その後の測定でそれほど大きな影響がないことがわかった(複数施設での検討)。今回の結果を見る限り一昨年指摘した機器設定の問題に立ち返ることになる。いくつかの施設からCompファイルを送っていただき検討したが設定数値には大きな隔たりがあり, 結局わかったことは, 「機器毎に最適なCompファイルを設定する」しかないということであった。現在メーカーの担当者も交えてどのような設定マニュアルが望ましいのか検討中である。

次に, 今回の解析で気づいたのは, 取り込みEvent数の問題である。総数としては問題ないものの, class Iピーズとclass IIピーズのEvent数に大きな隔りがある施設がいくつか見受けられた(4ページ)。元々全般的にclass IIピーズの取り込み数が多くなる傾向はあったものの, 2倍以上違うのは設定に何らかの問題がある可能性がある。各施設でも検討していただきたい。

## 5. まとめ

3ページにも示したがSCの参加施設数に大きな増減はないものの今回SAの参加施設は減少している。一方でLABScreenを使用する施設が増加している。おそらくSCはFlowPRAで, SAはLABScreenでという傾向が今後ますます強まることが予想される。そのためにもSCで抗体の有無を確実にチェックすることはますます重要となる。

報告集の最後にまとめているが, 機器設定とメンテナンスの重要性を再確認していただきたい。またそのためにQCWS検体を有効に利用していただければ幸いである。

# 第14回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 LIFT 法および FCXM の検査状況の解析—

宮崎 孔

北海道赤十字血液センター

## はじめに

LIFT法の参加施設は計6施設、抗体スクリーニングは4施設、FCXMは5施設であった。6施設のうち、IgM抗体を単独で測定している施設が1カ所、HLA class-II抗体を測定している施設も1カ所しか無かったため、ここではclass-IのIgG抗体のみを解析対象とした。

結果の解析は各施設から提出されたLIFT法の結果(score)を用い、本ワークショップでLABScreen Single Antigen (LABSA)を実施した18施設の平均蛍光値を基準として評価した。評価のポイントは、LIFT法で検出可能と考えられるLABSAの平均蛍光値が5,000以上の抗体特異性を検出できること、および偽陽性の有無に注目した。加えて、各施設の判定方法を検証するため、提出データを全て同じ基準で再判定した。

## 1. HLA 抗体検査

4施設でのHLA抗体スクリーニングの結果は、SH2201～SH2204の4検体のうち、SH2203以外は全ての施設でHLA抗体陽性と判定された。SH2203については施設によって陽性と陰性に分かれた(HP 5ページ)。

各検体の特異性は、LABSAの平均蛍光値が5,000以上の反応性の強いものに限定すると、SH2201は、A24+B13+B27+B35+B37+B38+B44+B46+B51+B52+B56+B58+B59+B62+B71+B75+Cw9+Cw10 (=Bw4+B35+B46+B56+B62+B71+B75+Cw9+Cw10)、SH2202はB62+B75、SH2203はA30+A31、SH2204はCw4+Cw5+

Cw6+Cw9+Cw10+Cw15となる。LIFT法では検査に使用するパネルリンパ球の数によって特異性を確認できるHLA抗原数が異なるため、施設によって確認できた数は異なるが、上記の抗原は概ね検出できている。この中で明らかに検出できなかった特異性はSH2201のCw9+Cw10、SH2203のA30+A31のみである(HP 6～9ページ)。このうち、SH2203はA31リンパ球で吸収してもLABSAでのA31に対する反応性が減弱しないため、自然抗体様のHLA抗体と考えられ、いずれの施設でもA31との反応は陰性であった。しかし、施設によってはA31以外の反応(偽陽性)が認められ、これが施設間不一致の原因となった。また、LABSAの平均蛍光値が少し低い1,000～5,000の抗体特異性としてSH2201でA33、B54、SH2202でB35、B51、SH2204でCw12が認められたが、いずれもLIFTは陰性であった(HP 10ページ)。

HLA抗体の特異性解析では検査に用いるパネルリンパ球数が重要になり、パネル数が少なければ判定保留であるscore 4が多くなり、抗体特異性、許容抗原を決めることはできない。また、偽陽性や偽陰性が発生する可能性も高くなる。実際にSH2203についてはLIFT法ではHLA抗体陰性と判定されるはずであるが、パネル数が少ない施設(22S16、22S30)では偽陽性を否定できなかったため、HLA抗体スクリーニング陽性と判定された。使用するパネル数が検査精度に直結するため、より多くのパネルを使用すること、さらに多検体を処理できるLIFT法のプロトコルを採用することが重要である。

各施設の提出データを再判定をしたところ、判定

ミスがいくつか認められた。多かったのは判定保留 (score 4) を陽性、あるいは陰性と判定しているものである。特異性の判定は、抗原別に各パネルとの反応を解析するため複雑な作業となり、十分な注意が必要となる。

## 2. FCXM

5施設での検体 SH2201 を用いたクロスマッチの結果は、LABSA での HLA 抗体の特異性から予測される結果 (抗 Bw4+B35+B46+B56+B62+B71+B75+Cw9+Cw10) とほぼ一致した (HP 11~12 ページ)。不一致が認められたのは抗体検査で偽陰性を示した Cw9, Cw10 に対する反応で、クロスマッチでも陰性を示した。各施設の判定基準は異なっているが、平均蛍光値のデータが提出された3施設 (22S02, 22S04, 22S24) の結果を S/N 値 (サンプルの蛍光値/NC の蛍光値) で評価すると、ほぼ同様な値を示しており、プロトコールが異なってもほ

ぼ同じ結果であることが示された。前年のワークショップでは施設間の判定不一致が認められていたが、本年度は全施設で一致した結果が得られた。ただし、施設によっては陰性となるクロスマッチの組み合わせが無かったため、適切な評価ができない場合もあった。クロスマッチの検査精度の評価には陽性および陰性となるの組み合わせが必要になるため、次回からは全ての施設で陽性・陰性のクロスマッチデータの提出が望まれる。

LIFT 法は FlowPRA や LABSA に比べると抗体検出感度が若干低いが、臨床的な意義が無いと考えられる自然抗体様の反応を検出しないというメリットがある。安全で有効な移植・輸血のためには高感度な抗体スクリーニング検査と直接クロスマッチの組み合わせがベストであると考えられるため、今後もより多くの施設が FCXM の QC ワークショップに参加することを期待する。

# 第14回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 LABScreen による抗体解析—

高 陽 淑

大阪血液センター検査三課

## はじめに

本稿では、項目ごとの要旨について述べる。詳細データについては、日本組織適合性学会のホームページに掲載された解析結果を参照されたい。

## 1. LABScreen での検査状況について

今回 LABScreen 法による検査実施施設は 20 施設 (臓器 11, 造血 13, 輸血 11: 重複あり) であった。また使用した試薬については昨年と同様で、Single antigen がクラス I 抗体で 18 施設、クラス II 抗体で 13 施設と非常に多かった一方で、PRA は 4 施設と

少なかった。今回の QCWS の抗体部門参加が 41 施設、そのうち抗体特異性解析まで実施している 31 施設中の 58% が LABScreen single antigen を用いていることから抗体特異性解析の手段としては最も支持されているようであった。

## 2. 抗体有無判定結果の比較

抗体の有無についてはクラス I では SH2003 が、クラス II では SH2001, 2003, 2004 が 100% 一致にはならなかった。その原因は、結果の記入ミス、Mixed のみで判定、single antigen の Lot 間差や判定基準の

施設間差が考えられた。

### 3. サンプルの特徴と抗体特異性結果の比較

LABScreen single antigen によって抗体特異性を決定した施設の各々の結果を比較して75%以上一致した特異性を各サンプルの「Consensus results」とし、各施設の判定結果が陰性、陽性共に75%未満となりConsensusが得られなかった特異性を「判定保留」と位置づけた上で各サンプルの反応性の特徴と不一致の原因を調査した。

- ① 強い抗体を広範囲に保有するが陽性と陰性の境界が比較的判断しやすいサンプル〔SH2001 (クラス I)〕: 4種類のサンプル中、Consensus results が最も多く求められた。判定保留となる原因は、反応性の施設間差や allele 違い beads の反応性差に対する判断の違いであった。
- ② 強い抗体は一部であるが弱い反応がだらだら続くサンプル〔SH2002 (クラス I & II)〕: 4種類のサンプル中、判定保留が最も多かった。その原因としては、多くの beads の反応性が BNV (Baseline Normalized Value) 2000~500 前後の範囲に含まれてカットオフの設定が困難になること、一部の抗原において Lot 間差が見られたことなどが考えられた。また、クラス II では DQ 抗原 beads の反応性を解析する際に、DQA1, DQB1 allele の違いについても考慮しているか否かで最終判定に差がみられた。
- ③ 反応は一部の抗原に限定しているサンプル〔SH2003, SH2004 (クラス I)〕: SH2003 については A30, A31 に反応性は限定しており、single antigen を用いた施設は100%の一致率であった。しかしながら Mixed では1施設を除いて陰性反応となり、Mixed のみで最終判定を出した3施設が不一致となった。また、SH2004 が保有する C ローカス抗体については、single antigen を用いることで殆どの施設が正確に検出することができていた。
- ④ 全体に反応性が弱いサンプル〔SH2004 (クラス II)〕: 4種類中、全体の反応性が最も低いサンプルで唯一 Consensus results が得られなかった。「抗体無し」とした3施設と「抗体有り」とした施設の Lot が違うことから Lot 間差も影響していると

考えられた。

- ⑤ 抗体の有無の判断が困難なサンプル〔SH2003 (クラス II)〕: このサンプルを「クラス II 抗体有り」と判定したのは single antigen のみを実施していた2施設で、他の施設は Mixed, PRA II あるいは Flow PRA などの他法でスクリーニングを実施し、その結果も考慮して「クラス II 抗体無し」と判定していた。一方、このサンプルについては single antigen を実施した6施設中同じ Lot を用いた5施設の反応性には大差を認めなかったことから single antigen はあくまでも抗体特異性の解析に用いる試薬であり、抗体の有無を判断する場合においては、スクリーニング試薬での測定が重要であると考えられた。

### 4. 総合評価

各サンプルの抗体有無の結果が75%以上一致する判定を「正解」とした場合、参加した20施設のうち全て正解となった施設は5施設(20%)であった。クラス別にみると、クラス I については全体に一致率が高かったが、クラス II については、輸血部門が抗体の解析を実施していない施設が多い一方で、臓器部門の正解率が高い傾向を認めた。

また、抗原別判定結果の比較では、参加施設間で陰性/陽性の判断が大きく分かれてしまう(Consensus が得られない)ケースを除くと全体的に一致率は高く、結果が保留(スコア4を記載)や不一致になるのは特定の施設に限定されていた(詳細はホームページの施設別判定結果集計を参照)。

### 5. まとめ

結果の不一致の原因を大別すると以下のように集約される。

- ① 反応性の違い(試薬の選択, 施設間差, Lot 間差)
- ② 判定基準の違い(allele 違いの beads の反応性の判断, 低い蛍光値領域での判断)

この①, ②について全ての施設で完全に一致することは不可能であるが、QCWSでの自施設のデータを他施設の結果と比較するなどの考察をすることで差異を縮める事は可能であり、判定基準については、あくまでも部門ごとに模索していく必要があると考える。

# 第14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 & ICFA 法—

関根みゆき

東京都赤十字血液センター

## 1. WAKFlow HLA 抗体クラス I & II (MR)

### 1.1. はじめに

WAKFlow HLA 抗体検出試薬 (以下 WAK-MR) は 9 施設が使用し、その中で 7 施設がクラス I と II 両方、2 施設がクラス I のみの使用であり、前年度と同様であった。試薬ロットは J002 と K001 の 2 種が多くを占めていた (HP 掲載: 表 1)。血清中の非特異成分を除去する WAK-MR 専用の血清処理試薬は、4 施設が全サンプル、他の 4 施設が一部のサンプルについて使用し、1 施設は未使用であった (HP 掲載: 表 2)。

### 1.2. 結果と考察

#### 1) 各ビーズの反応性の比較

SH2201 及び試薬キット添付の陰性対照血清におけるバックグラウンドビーズの Median 値 (以下 BB 値) は、ロット J002 よりロット K001 の方が低い傾向であった (HP 掲載: 図 1, 2)。

一方、精製 HLA を結合した各 HLA ビーズの Median 値にロット差は認められなかった。Index 値は計算式の分母である BB 値に影響され、BB 値が高いロット J002 の Index 値平均はロット K001 より低い傾向になり、ロットによって検出される抗体特異性に相違を生じさせる可能性が考えられた。(HP 掲載: 図 3a-d)。

施設 16 では、陰性対照血清と SH2201 の双方において、BB 値と陽性コントロールビーズの Median 値が共に他施設と比較して低値を示し、洗浄など操作上の問題が考えられた。

#### 2) 各サンプルのセログラフ解析

各施設が設定した cut off 値に基づくビーズ毎の

Index 値をスコア化し、セログラフを作成した (HP 掲載: 図 4)。

SH2201 のセログラフから、HLA-A24, Bw4 及び B15 関連に対する広範囲の反応を認め、陰性反応ビーズの HLA 情報から容易に許容抗原を決定可能であった (HP 掲載: 図 5)。

SH2202 は、本試薬において高いバックグラウンドを示し、血清処理試薬の使用が有効であった。血清処理試薬使用群・未使用群のセログラフを作成し、使用群では、HLA-B62 の反応が明瞭であった (HP 掲載: 図 6a, b)。ロット別のセログラフ解析では、ロット J002 では HLA-B62 の反応しか認めなかったが、ロット K001 ではさらに B75, B35, B38 に対する反応も認め、BB 値のロット差が解析結果に影響を及ぼすと考えられた。LABScreen Single Antigen (以下 LS-SA) ではこれらの抗体特異性のうち HLA-B38 の反応は認められなかった (HP 掲載: 図 7a, b, 表 3)。

SH2203 のセログラフでは、WAK-MR で HLA-A31 に対する反応が認められ、LS-SA では HLA-A30, A31 とともに高い蛍光強度を示した。生細胞を用いた検査法 (LCT 法, AHG-LCT 法, LIFT 法, ICFA 法) では反応を認めなかった (HP 掲載: 図 8, 表 4)。WAK-MR と LS-SA で検出された反応は、細胞膜上に存在している状態の HLA 分子とは反応を示さず、本来の HLA 特異性ではなく自然抗体などのクロス反応と推測された。

SH2204 のセログラフでは、明確な特異性は認められなかった。LS-SA で検出できた HLA-C 座の抗体特異性を基に作成した WAK-MR のセログラフからも同定困難であり、WAK-MR は HLA-C 座抗体

の検出性能が不十分であることを確認した (HP 掲載: 図 9a, b, 表 5)。

一方, HLA クラス II 特異性において, SH2202 でセログラフの抗原指定を HLA-DR あるいは DQ どちらでも判定可能であり, 抗体特異性を確定することはできなかった。ただし, 陰性反応ピーズの HLA 情報から許容抗原は決定可能であった (HP 掲載: 図 10a, b)。

以上より, WAK-MR は許容抗原を確定する性能を有すること, 血清処理試薬の使用が有効であること, BB 値が原因となるロット間の整合性に問題があること, HLA-C 座に対する反応が不十分であることを解析した。

## 2. ICFA 法

### 2.1. はじめに

ICFA 法は 8 施設が使用し, その中で 3 施設がクロスマッチのみの参加であった。前年度の 5 施設 (クロスマッチのみ 3 施設) より, 3 施設の増加であった。全施設が WAKFlow HLA 抗体クラス I (ICFA) 試薬を使用し, 1 施設は自家調整 ICFA 試薬の併用であった (HP 掲載: 表 6)。

### 2.2. 結果と考察

各サンプルの Index 値をスコア化し, セログラフを作成した (HP 掲載: 図 11)。

SH2201 では, HLA-A24, Bw4 及び B15 関連を含む広範囲の反応を認め, WAK-MR で検出できな

かった HLA-B22 抗原グループの弱い反応を確認した (HP 掲載: 図 12)。

SH2202 では, WAK-MR と同様に HLA-B62 の反応を認めた。さらに WAK-MR で検出できなかった B75 では一部反応を示し, LS-SA の測定蛍光値で認められる B\*15:02 と B\*15:11 の反応強度の差を反映していることが推測されるが, パネル細胞の遺伝子型情報が不明のため断定はできない (HP 掲載: 図 13, 表 7)。

SH2203 では, WAK-MR の項目で述べたとおり, 精製 HLA 試薬で検出した HLA-A30, A31 を持つすべての細胞で陰性であった。(HP 掲載: 表 8, 9)。

SH2204 では, LS-SA でいくつかの HLA-C 座のピーズに対する測定蛍光値が 10,000 以上であり, ICFA 法ではこれらの抗原に対して一部を除き反応が確認された。LS-SA の HLA-Cw14 (HLA-C\*14:02) のピーズに対する反応は陰性であるのに対し, ICFA 法では一部の HLA-Cw14 抗原に対して反応が認められ, 反応を示した細胞のアリルは B 座との関連で HLA-C\*14:03 と推測したが, この結果からは不明であった。ICFA 法では, HLA-C 座に対する抗体を検出していたが, 弱い反応性であった (HP 掲載: 図 14, 表 10, 11)。

以上より, ICFA 法は WAK-MR より HLA 抗体の検出性能に優れていること, 特に HLA-C 座に対する抗体が検出可能なこと, 自然抗体などの非特異反応を検出しないことが確認され, クロスマッチに適した検査法であるといえる。

# 第14回 HLA-QC ワークショップレポート —部門別解析 DNA-QC および結果評価—

田中 秀則

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

DNA-QC には、58 施設の参加があり昨年と同数の施設数であった。輸血部門 27 施設、臓器移植部門 36 施設、造血幹移植部門 20 施設、その他 4 施設であり、うち 21 施設で重複がみられた。

以下に部門別解析および試行的に行った各施設の結果評価について概説する。本文中の図表については、MHC 誌紙面の都合上、学会ホームページに掲載されているので、そちらを参考にして頂きたい。

## 1. 部門別解析

### 1.1. 使用タイピング法について

各参加部門で使用しているタイピング法は、輸血、造血幹移植、その他の部門で、Luminex 法（蛍光ビーズ法）が、臓器移植部門では、SSP 法または RELI が一般的に使用されているタイピング法であった（表 1）。また、各タイピング法別の参加部門別の占有率は、RELI が臓器移植部門で約 70% 以上を占めていた（表 2）。

各タイピング法での解像度を比較するために、変異検出数（プローブまたはプライマー数）を表 3 に示した。SSP 法では 20 ヶ所以下であるが、他のタイピング法（LabTypeHD を除く）では、RELI で若干少ないものの大きな差はないと思われる。また、国産試薬の場合は日本人で一般的なアレルを出来るだけ絞り込むことが容易なプローブ構成となっている。各タイピング法で、タイピング対象となった HLA 座を表 4～表 7 に示した。各タイピング法、各参加部門でも HLA-A, B, DRB1 座は 100% 実施されていたが、HLA-C 座については RELI での実施率は 10～50% と低かった。

### 1.2. 表記法について

1987 年から HLA 分子をコードする HLA アレルを識別するために、4 桁の数字による命名規則が施行されたが、4 桁での管理が困難になり、2010 年 4 月から HLA アレルの命名規則を変更することとなった。新表記法では“:”（コロン）を用いて HLA アレルを規定する数字の表記区域を 4 つに分けることにより、固定した桁数の制限を取り除いた。これに伴い、当学会では「HLA タイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則（2010 年度版）」（以下、表記法）により新表記法に対応を行った。

QCWS における DNA 型表記の問題点としては、① アレル名の接尾符号である“N”（Null），“L”（Low）等は、Ambiguity を記載する場合に付記しないこと（例：A\*02:01/07/15N では“N”を付記しない）しているが、付記されている例があった。② HLA-C 座のローカス名の表記が、今回の命名規則変更でアレルを表記する場合は“Cw”から“C”に変更された（例：Cw\*0102→C\*01:02）が、旧ローカス名でのアレル表記が見られた。③ その他、アレル表記には“\*”（アスタリスク）が必要であるが記載されていない等の問題点があった（表 8 参照）。

QCWS での HLA 型（HLA 抗原型）の表記では、表記法で規定されていない幾つかの問題点があった。DNA 型を Ambiguity で表記した際、対応 HLA 型が複数の場合の HLA 型の表記法が規定されていない。例えば、DNA 型が DRB1\*14:03/12/18<sup>+</sup> の場合、HLA 型は DR1403 または DR14 の可能性があり、HLA 型表記は DR14/1403 と表記する必要がある。また、HLA-C 座の HLA 型は、HLA-Cw1～Cw10 は公認抗原であるが、HLA-C\*12～18 に対応

する HLA 型は公認されておらず、今後の HLA-Cw12~18 の HLA 型を QCWS として使用するべきかが問題点として上げられた (表 9 参照)。これらの問題点については、今後標準化委員会で協議し解決する必要がある。

タイピング結果評価を行う際に、以下の 3 点の問題点が見出された。① SBT 法で最新のライブラリーを使用していない、② Ambiguity があるはずなのに、結果に代表的なアリルだけを記載している、③ SBT 法で、第 3 区域まで絞り込めているはずだが、結果は第 2 区域までしか表記していない。また、表記法の規定に不備があることから問題となる例があった。例として、HLA-A\*24:02/07/10/+ と結果を表記されていたが、HLA-A\*24:02/03/07/+ が正しい表記であった。現在の表記法の規定では、「最も小さい数を最初に書く」と規定されているが、Ambiguity となるアリルを数字の小さい順に記載するという規定はなく、今後検討する必要がある (表 10 参照)。

## 2. 結果評価

### 2.1. 概要

これまで QCWS の結果については、その状況を報告するだけで各施設の結果について評価を行っていなかった。今回試行的に、HLA-DNA タイピングの QCWS (以下、DNA-QC) 結果を、① 判定結果、② 結果表記、③ 試験・検査状況の 3 項目について評価を行った。詳細は「HLA-QC ワークショップ結果評価の基準」(学会ホームページ「14 回 QCWS 報告書」に掲載)を参照されたい。

### 2.2. 評価内容 (試行)

判定結果については、基準にもあるように「各 HLA タイピング法での判定結果が妥当であること」、「各 HLA タイピング法の判定結果と総合判定結果に祖語がないこと」について各解析担当での評価を

行った。これら 2 項目については、各タイピング法別に、検体別、タイピング実施座別に両方の基準が適合している場合を 60 点、何れか片方が適合しない場合は 0 点と採点し、各採点の平均点数をその施設の評価点とした。今回参加した全施設の平均点は、56.7 点であった (表 12 参照)。また、結果表記の評価基準は、「提出結果が、日本組織適合性学会で規定している表記法に従って記載されていること」とし、参加全施設の平均点は、37.3 点となった (表 13 参照)。

判定結果と結果表記の評価の合計点の分布を表 14 に示した (平均点: 94.0 点)。総合的な判定区分として、判定結果と結果表記の評価の合計点から 100 点を“A: 良好”, 60~100 点未満を“B: 要確認”, 0~60 点未満を“C: 要改善”とした。各判定区分での施設数は、A 評価が 23 施設、B 評価が 34 施設、C 評価が 1 施設であった。

試験・検査状況の評価については、「HLA タイピング実施時に得られた試験結果 (データ) が適切であること、また判定が適切に行われていること」とした評価であるが、① 試験結果が全て妥当である場合を“A”, ② 反応データの一部に不備がある場合を“B”とし、この場合の「一部」とは半数以下を基準とした。③ 反応データのほとんどが不備である場合を“C”とし、この場合の「ほとんど」とは半数以上を基準とした。各方法別の評価結果の分布を表 15 に示した。

### 2.3. 結語

評価結果については、既に各施設に報告してある。今後この評価結果を基に検査施設での改善が図ることが出来れば QCWS での評価も意味があることと考える。また、評価基準については参加施設からの意見を頂き、より良い基準作りを行ってゆく予定である。

# 第14回 HLA-QC ワークショップレポート —部門別解析 抗体 QC および結果評価—

中島 文明

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

## 1. 部門別解析

### 1.1. 概要

抗体 QC は昨年度より 5 施設増え 41 施設の参加があった。輸血部門 22 施設、臓器移植部門 24 施設、造血幹移植部門 16 施設、その他 2 施設であり、うち 16 施設に重複がみられる。

単一部門施設のみで検査方法別に比較すると、従来、輸血部門=LABScreen, 臓器移植部門=FlowPRA という傾向があったが、現在の状況は均一化の方向にある。赤十字血液センターでは LCT 法から蛍光ビーズ法への移行が進行しており、LCT 法は減少し、WAKFlow, ICFA 法が増加している。輸血部門は、血小板抗体の検出を必要とするため、MPHA など関連した方法が残っている。これらは、HLA 抗体の検出は補足的にできるものであり、本ワークショップの方向とは若干異なるが、施設の経済状況などでその検査法しか採用できない事情も考慮し除外対象とはしていない。

### 1.2. 部門別解析

抗体検査の部門別解析について考察する。輸血部門では、病院輸血部と赤十字血液センターとで両極を成しており、前者は抗体検出、後者は許容抗原決定とクロスマッチの判定を主な業務とする。輸血副作用調査では、抗体特異性とクロスマッチを必要とする。臓器移植部門では、抗体検出とクロスマッチの判定が重要と思われる。輸血部門=MPHA, LABScreen, 臓器移植部門=FlowPRA という傾向は、各部門が求める方法を反映した結果である。近年は、測定機器の整備と試薬の充実でその傾向は崩れつつある。造血幹移植部門は、仮想クロスマッチの機会が

多くなるため、抗体特異性が重要となる。その他、検査センターや試薬開発では特殊な試験方法を含めさまざまな方法が要求されると思われる。

今後、施設認定を視野に入れた場合、各部門に必要とされる項目が何であるかが評価要素となる。しかし、幾つかの問題点も存在し、まず、多くの施設が複数部門に重複していること。同一部門でも業務範囲が異なるケースがあること。関連して、求める HLA 座や検出するイムノグロブリンサブクラスが異なること。検査センターや試薬開発では一律に括れないなど、部門単位で一定の対応が困難な実情がある。部門の分類方法を根本的に見直す必要性がある。

### 1.3. クロスマッチ

クロスマッチは昨年と同様な方法で試行し、臓器移植部門の参加もあり、若干の増加傾向にある。11 施設の参加があり、検査方法は LCT, AHG-LCT, FCM, ICFA で実施された。部門別では、輸血部門は、詳細な許容抗原決定とダイレクトクロスマッチの実手技、臓器移植部門はダイレクトクロスマッチの実手技、造血幹移植部門は詳細な抗体特異性検出と仮想クロスマッチが解析ポイントと考える。クロスマッチは部門別解析の重要な位置づけになり、施設評価の要素にもなるため、今後、多くの参加を希望する。

## 2. 結果評価

### 2.1. 概要

施設認定の指標となる抗体 QC 結果評価を試行した。詳細は「HLA-QC ワークショップ結果評価の基準」を参照されたい。抗体 QC では、移植や輸血な

ど異なった分野，採用する検査方法，判定基準など様々な要因で一律に評価することが極めて困難である。抗体検出，抗体特異性，結果提出方法を評価基準の柱とし，部門別要件は施設認定する際に勘案するという形とした。したがって，抗体 QC の結果評価には部門別要因は加味されていない。

## 2.2. 評価内容（試行）

前述のとおり，抗体 QC 結果に正解は存在しない。そこで，抗体 QC 結果で3分の2（67%）以上の施設で共通となる結果を評価基準とした。各施設では，複数の検査方法を採用することもあり，総合判定結果を評価対象とした。抗体特異性については，日本骨髄バンクが公表する HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の抗原を対象とした。それぞれの評価点を ABC 評価に置き換え評価結果とした。さらに，結果提出ルールや記入方法から外れる場合を減点対象とした。

HLA 抗体検出を日常実施する施設とその担当者の集まりである本 QC ワークショップにおいて3分の2以上で共通となる結果は，国内において最も信頼性の高い結果であり，そこに評価基準を求めることは極めて妥当性が高いと考える。また，抗体特異性は便宜上，反応した抗原名を列挙して表現するが，実際は各抗原の共通エピトープに対する反応（アロ血清

はその集合体）であるので，国内でほとんど検出されない抗原名を表記することは混乱するだけで意味をなさない。さらに，検出感度の低い方法や反応させる抗原種類が不十分な場合は必然的に評価点が低下する。

今回，試行した評価別構成比をグラフに示す。抗体検出では 85.4%，抗体特異性では 66.7% が A 評価であり，良好な結果と思われる。B 評価は改善が見込まれる位置づけであり，ワークショップの解析結果を精査・再確認して問題点の解決を図っていただきたい。C 評価は検査方法を含めた根本的な解決策を望む。

## 2.3. 結 語

今後は，参加者の意見を反映しながら，QC ワークショップ部会で検討を重ね，施設認定として適切な内容の評価に近づけたい。また，クロスマッチを導入してその結果も評価対象としたい。クロスマッチは直接，医療行為に結びつく検査であり，抗体検出より重要度は高い。しかし，その実態は十分に把握されていない。理想的には共通となる細胞を配布したいが実情として困難である。これまで2年間実施した方法での参加状況を考慮しながら組み込めなにか検討していくこととする。