

# 第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート

## 第 15 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<sup>#</sup>

# : 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>, 石塚 敏<sup>2)</sup>, 太田正穂<sup>3)</sup>, 木村 彰<sup>4)</sup>, 高 陽淑<sup>5)</sup>, 小林孝彰<sup>6)</sup>, 佐田正晴<sup>7)</sup>, 中島文明<sup>1)</sup>, 成瀬妙子<sup>4)</sup>, 橋口裕樹<sup>8)</sup>, 宮崎 孔<sup>9)</sup>, 森島泰雄<sup>10)</sup>, 安波道 郎<sup>11)</sup>, 山本 賢<sup>12)</sup>

(所属 : <sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液研究所, <sup>2)</sup>東京女子医科大学腎センター移植免疫研究室, <sup>3)</sup>信州大学医学部, <sup>4)</sup>東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, <sup>5)</sup>大阪府赤十字血液センター, <sup>6)</sup>名古屋大学免疫機能制御学寄附講座, <sup>7)</sup>国立循環器病センター再生医療部, <sup>8)</sup>福岡赤十字病院, <sup>9)</sup>北海道赤十字血液センター, <sup>10)</sup>愛知県がんセンター中央病院・血液細胞療法部, <sup>11)</sup>長崎大学熱帯医学研究所, <sup>12)</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 23 年 1 月から QCWS 開催及び参加申込みについて、学会誌及び学会ホームページ（以下、HP に）掲載することで案内した。今回から QCWS への参加を、会員個人参加から施設参加とし、平成 23 年 2 月 18 日までに 67 施設（DNA-QC : 59 施設、抗体 QC : 39 施設）から参加申し込みがあった。

平成 23 年 2 月から、今回の方針について 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、臨床部門別での解析については、今年度も実施することとし、参加申込の際に①輸血、②臓器移植、③造血幹細胞移植、④その他（研究等）の 4 部門における QCWS の結果解析を行った。また、参加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。

4 月 5 日に試料を発送し、4 月 15 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 4 月 30 日とした。震災の影響及び一部試薬の供給停止の影響により、最終的には 56 施設（DNA-QC : 51 施設、抗体 QC : 38 施設）から結果が提出された。

5 月中に生データの取りまとめ、6 月中に各解析担当者による解析が行われ、7 月上旬に各検査法別結果を学会ホームページ（以下、学会 HP）に順次掲載し、各検査法での解析結果に基づき、部門別解析を行い、その結果を 8 月 10 日に学会 HP に掲載することで、参加者が必要に応じてダウンロード出来るようにした。

### 2. QCWS のテーマ及び試料選択について

DNA-QC のテーマは、①正確な DNA タイピングが出来ること、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、前年度の 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」、「日本人由来で稀な HLA アリルであること」の要件に合う細胞を 2 種類購入し、過去使用した細胞を含め 4 細胞から抽出した DNA の配布を行った。

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、③HLA-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、①IgGとIgMのHLA抗体が含まれること、②HLA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法及び④結果の表記法について、抗体QCでは、①FlowPRA法、②Lab Screen、③プロゾン様現象に関する追加発言、④WAK FlowおよびICFA法、⑤その他検査法およびクロスマッチの5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）での検査実施状況の解析及び「HLA-QCワークショップ結果評価の基準」に従った提出結果の評価を行い、その状況について解析した。各解析分担項目と解析担当者（所属）は、以下のとおりである。

#### 1) タイピング結果解析

- 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）

表 1. 第 15 回 QCWS 参加施設

1	山田赤十字病院	輸血検査室	29	熊本大学医学部附属病院	中央検査部
2	日本赤十字社 中央血液研究所	研究開発部	30	北海道大学病院	検査・輸血部
3	大阪府赤十字血液センター	検査部 検査三課	31	徳島大学病院	輸血部
4	広島県赤十字血液センター	技術部 検査課	32	仙台社会保険病院	検査部
5	東京都立小児総合医療センター	検査科 輸血検査室	33	福岡赤十字病院	検査部 HLA 検査室
6	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	34	愛知県赤十字血液センター	検査一課
7	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部	35	大分県立病院	輸血部
8	獨協医科大学病院	臨床検査部	36	東京女子医科大学	腎センターE4 移植免疫研究室
9	香川県立中央病院	中央検査部	37	特定非営利活動法人 HLA 研究所	
10	NPO 法人腎泌尿器疾患研究所		38	株式会社 リプロセル	技術部
11	東海大学医学部付属病院	臨床検査技術科 移植免疫検査室	39	東海大学	医学部基礎医学系分子生命科学
12	東京都赤十字血液センター	検査一部 検査二課	40	松江赤十字病院	検査部
13	岡山県赤十字血液センター	検査課	41	株式会社エスアールエル	信頼性保証部門品質保証部 品質保証企画グループ
14	日本赤十字社 九州血液センター	検査二課	42	株式会社 医学生物学研究所	営業推進部
15	高知医療センター	MCM 検査室	43	虎の門病院	輸血部
16	関西医科大学附属病院	輸血部	44	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
17	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部	45	株式会社ビー・エム・エル	特殊分析部 ゲノム検査課
18	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	46	湧永製薬株式会社	試薬・診断薬事業部
19	公立大学法人 横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部	47	国立循環器病研究センター	臨床検査部 輸血管理室
20	近畿大学医学部附属病院	輸血部	48	札幌北楡病院	臨床検査科
21	富山大学附属病院	輸血・細胞治療部	49	宮城県赤十字血液センター	技術部検査一課
22	兵庫医科大学病院	輸血部	50	国立病院機構千葉東病院	臨床検査科 HLA 検査室
23	株式会社 ベリタス	技術営業部	51	名古屋第二赤十字病院	医療技術部 組織適合検査室
24	鷹揚郷腎研究所 弘前病院	HLA 検査室	52	県立広島病院	臨床研究検査科
25	広島大学病院	輸血部	53	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部
26	三重県赤十字血液センター	学術品質情報課	54	大阪府立急性期・総合医療センター	臨床検査科 組織適合性検査室
27	静岡県立総合病院	輸血・細胞治療室	55	三菱化学メディエンス株式会社	遺伝子分析研究部 細胞性免疫グループ
28	北海道赤十字血液センター	検査部 検査三課	56	社会保険中京病院	検査部

- ③ DNA 検査法解析 (Luminex, SBT 以外): 安尾美年子 (東京女子医大)
- ④ 結果の表記法: 橋口裕樹 (福岡赤十字病院)
- 2) 抗体検査結果解析
- ① FlowPRA 法の検査状況の解析: 石塚 敏 (東京女子医大)
- ② Lab Screen による抗体検査: 宮崎 孔 (北海道血液センター)
- ③ (追加発言) 抗体検査におけるプロゾーン様現象: 藤井直樹 (HLA 研究所)
- ④ (追加発言) LABScreen Single Antigen とプロゾーン様現象: 黒田ゆかり (九州血液センター)
- ⑤ (追加発言) QCWS 試料について: 中島文明 (中央血液研究所)
- ⑥ WAK Flow および ICFA 法による抗体検査: 平田康司 (岡山県血液センター)
- ⑦ その他検査法およびクロスマッチ: 中島文明 (中央血液研究所)
- 3) 部門別解析及び結果評価  
参加部門での現状と結果評価 (施設別)

- ① DNA タイピング: 田中秀則 (中央血液研究所)
- ② 抗体検査: 高 陽淑 (大阪府血液センター)

## 5. QCWS サンプルの総合結果

各施設の精度管理, 技術訓練に役立てることを目的に, DNA 及び抗体サンプルの総合結果を示す。DNA サンプルは, 本ワークショップで解析したデータに中央血液研究所で精査した結果を追加し, 総合的にリアサインした。HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 領域は, 1 本鎖 DNA に調製して塩基配列を確定し Ambiguity を回避した結果を示す。解析データベースは IMGT/HLA Database Sequence Alignments based on Release 3.4 (Apr-2011), 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) に則り記載した (表 2)。また, 抗体サンプルは, 抗体 QC 参加施設の総合判定結果を集計して, 3 分の 2 以上の参加施設が陽性あるいは陰性判定した抗原をスコアで示した (表 3)。

表 2. 第 15 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	
<b>H2301</b>	A*24:02:01:01 <b>A24</b>	A*26:02 <b>A26</b>	B*15:01:01:01 <b>B62</b>	B*52:01:01:01 <b>B52</b>	C*03:03:01 <b>Cw9</b>	C*12:02:02 <b>Cw12</b> ※
<b>H2302</b>	A*26:02 <b>A26</b>	A*31:01:02 <b>A31</b>	B*15:01:01:01 <b>B62</b>	B*39:02:02 <b>B39</b>	C*03:03:01 <b>Cw9</b>	C*07:02:01:01 <b>Cw7</b>
<b>H2303</b>	A*03:02 <b>A3</b>	A*24:02:01:01 <b>A24</b>	B*07:02:01 <b>B7</b>	B*13:02:01 <b>B13</b>	C*06:02:01:01 <b>Cw6</b>	C*07:02:01:01 <b>Cw7</b>
<b>H2304</b>	A*26:03:01 <b>A26</b>	- <b>-</b>	B*35:01:01:01 <b>B35</b>	B*51:01:01 <b>B51</b>	C*03:03:01 <b>Cw9</b>	C*14:02:01 <b>Cw14</b> ※
HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
<b>H2301</b>	DRB1*14:12:01 DRB3*01:01:02:01 <b>DR14</b> <b>DR52</b>	DRB1*15:02:01 DRB5*01:02 <b>DR15</b> <b>DR51</b>	DQA1*01:03 DQB1*03:01:01 <b>DQ7</b>	DQA1*05:03/07 DQB1*06:01:01 <b>DQ6</b>	DPA1*02:02 DPB1*05:01 <b>DPw5</b>	DPA1*02:01 DPB1*09:01 <b>DPw9</b> ※
<b>H2302</b>	DRB1*14:06:01 DRB3*02:02:01 <b>DR14</b> <b>DR52</b>	DRB1*14:54 - <b>DR14</b> <b>-</b>	DQA1*01:01/04/05 DQB1*03:01:01 <b>DQ7</b>	DQA1*05:03/07 DQB1*05:03:01 <b>DQ5</b>	DPA1*02:02 DPB1*05:01:01 <b>DPw5</b>	- - <b>-</b>
<b>H2303</b>	DRB1*01:01:01 DRB4*01:01:01:01 <b>DR1</b> <b>DR53</b>	DRB1*07:01:01:01 - <b>DR7</b> <b>-</b>	DQA1*01:01/04/05 DQB1*02:02 <b>DQ2</b>	DQA1*02:01 DQB1*05:01:01 <b>DQ5</b>	DPA1*02:02 DPB1*05:01 <b>DPw5</b>	DPA1*02:01 DPB1*09:01 <b>DPw9</b> ※
<b>H2304</b>	DRB1*13:07:01 DRB3*01:01:02:01 <b>DR13</b> <b>DR52</b>	DRB1*14:03:01 DRB3*02:02:01 <b>DR1403</b> <b>DR52</b>	DQA1*05:03/07 DQB1*03:01:01 <b>DQ7</b>	DQA1*05:05/09 - <b>-</b>	DPA1*01:03 DPB1*02:01:02 <b>DPw2</b>	- - <b>-</b>

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



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

なお、詳細なデータについては、学会ホームページに掲載の「15 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

各参加施設のデータ比較では、概ね良好であったが、一部の施設で反応データの不備やアサインミスが見られた。反応データの不備については、HLA-DRB1 の陽性コントロールピーズ蛍光値の平均値が低く、ばらつき (%CV) が 67.2% と大きい施設が 1 施設あった。当該施設の 4 検体 (H2301 ~ H2304) の蛍光値は、1847, 725, 5332, 2254 と H2303 以外は蛍光値が低く、他施設の値と比較すると半分以下で PCR の増幅不良が疑われた。増幅不良の場合、当然ながら P/N 値も全体的に低くなり、アサインミスの原因ともなりうる。当該施設の判定結果自体には問題が見られなかったが、HLA-B, C についても HLA-DRB1 と同様の傾向が見られ、PCR の工程 (DNA の濃度や純度、増幅試薬の調整、サーマルサイクラーの温度等) に問題がないかチェックする必要があると考えられた。

各施設のカットオフ値の変更状況では、複数の施設が同じプローブのカットオフ値を変更しているものがいくつか見られた。原因としては、非特異反応や特定のアリルに対するクロス反応が高い場合、特

定アリルとの反応が弱い場合等のある程度試薬の性能に起因すると考えられる。カットオフ値については、各メーカー内の試験結果より設定されており、同一のプローブであってもロットにより異なることがある。大部分は設定どおりの性能がでているが、一部その設定値が高い場合、あるいは低い場合もあり、個々のプローブの特性を把握することは、判定を行う上で大変重要である。

アサインミスについては、昨年同様 5 件 (HLA-A: 1 件, HLA-B: 2 件, HLA-C: 1 件, HLA-DQA1: 1 件) あり、原因としては、プローブとの反応が偽陽性によるものが 2 件 (No. 1, 5), 偽陰性によるものが 3 件 (No. 2, 3, 4: 同一施設) であった。No. 4 については、本来陽性となるべき 3 つのプローブとの反応が弱く、非特異反応の強い陰性プローブも散見され、判定するには苦慮するデータであり、再検査し確認する必要があると考えた。他の 4 件 (No. 1, 2, 3, 5) については、反応データに大きな問題はなく、判定用ソフトの出す警告 (偽陽性や偽陰性の可能性のあるピーズ No. の表示等) や判定結果のタイプ、各プローブとの反応を慎重に判断すれば防げた判定ミスであると思われた。

Luminex 法は、プローブの種類が多く、数個のプローブの判定をミスしても何らかのタイプがアサインされてしまうことがある。この様なミスを防ぐためには、使用する試薬の特性を良く理解すると共にアリルに対する知識 (頻度やハプロタイプ等) も必要である。

# 15 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 (HP 掲載結果：表 2)

SBT 法の参加施設は 6 施設で、HLA-A, B, DR は全施設、C は 5 施設、DQB1, DPB1 は 2 施設がタイピングを行った。使用されたキットは AlleleSEQR (abbott) のみであった。昨年シークエンスプライマーが改良された AlleleSEQR DRB1 キット (abbott) を使用するには、解析ソフト上の設定変更が必要であるが、その事実を知らない施設および販売企業があった。その為、施設によって DRB1 の結果に違いが生じたが、どちらの結果も正解とした。

## 2. 解析結果と考察 (HP 掲載結果：図 1-4)

今回 3 種類の表記ミスが認められた。表 3 に示すように、ほとんどが①の第 1 区域アンビグニティーにおける表記ミスであった。

### 1) 第 1 区域アンビグニティー表記法における不正解

HLA-B の H2301 と DPB1 の H2301 および H2303 において、第 1 区域で区別出来ないアンビグニティーとなった。HLA-B では、Allele1 の群が全て B\*15 に対し、Allele2 の群は B\*52 と B\*78 が混在している (図 1)。この場合の表記は、「HLA タイピング結果のアリル表記法と結果報告の原則」の II.1 (2) に相当するため、B\*15:01/24/38/+、B\*52:01/78:05/+ が正解となる (図 2)。しかし、6 施設の結果を集計すると 4 パターンの回答が得られた (①～④)。同様に、HLA-DPB1 においても Allele1 の群で DPB1\*05 と DPB1\*22、Allele2 群では DPB1\*09 と DPB1\*35 が混在している (図 1)。HLA-B の場合とは異なり、両方のアリル群での第

一区域アンビグニティーとなる。この場合は、「アリル表記法の原則」の II.3 に相当するため、DPB1\*05:01//+、DPB1\*09:01//+ が正解となる (図 3)。やはり、回答した 2 施設で表記が異なった (①, ②)。

このように、第 1 区域アンビグニティーの表記方法を理解していない施設があり、このことは「アリル表記法の原則」の説明文が初心者には分かりづらいことが一因かもしれない。

### 2) Null アリルの表記法における不正解

Null アリルの表記は毎年ミスが認められ、今年も表記内に「N」を記載した施設があった。複数の候補アリルの中に Null アリルが存在する場合は、「アリル表記法の原則」の II.2 に記載されている通り、「第 2 区域の数字」を記載するため、HLA-C の H2301 においては、C\*03:03/20N/69 ではなく、C\*03:03/20/69 が正解となる (図 4)。

## 3. まとめ

今年の不正解の主な原因は表記ミスであった。例え正確で精度の高い解析が出来たとしても、表記ミスをすることで意味合いの全く違い、間違った結果報告をしていることになる。誰が見ても判定結果を正しく把握させるためには、決められた表記法を守り、正しく報告することが肝要である。

また、改良キットを使用するに当たり、解析ソフトの設定を変更する必要があることを知らない施設およびソフト販売会社があった。アンビグニティー解消のため、以前よりも広い塩基配列領域の解析が出来るように DRB1 のキットが改良されたが、解析ソフトの設定変更をしていなかった施設は、

改良キットを使用しているも、改良前と変わらないタイピング結果となった。施設内だけでの評価では気づきにくく、今回のように複数施設のデータを比

較することで発見できたことから、このようなQCワークショップに積極的に参加することで施設のタイピング精度を担保できると思われる。

## 第 15 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—

安尾美年子

東京女子医科大学腎センター移植免疫研究室

### 1. はじめに

今回の DNA-QCWS は例年と異なり、これまで参加施設の 3 割近くが使用していた SSO 法の RELI キットが製造停止となったため、試薬が不足している施設やこれに代わるキットが決まっていない施設はデータの提出を見合わせた。また、残り少ない RELI では再検査の余裕がなかった施設や、使い慣れないキットを使用した施設もあったようである。また、東日本大震災の影響もあり、RELI での参加は 6 施設のみとなった。このデータについては残りの試薬がある間だけの使用となるため、詳細な検討は省略させていただいた。

尚、2 種類以上のキットを使用した施設において、方法別のアレル判定シートへの結果記入が方法別ではなく総合判定となっている施設があり、今後データの提出要領を徹底したい。

### 2. SSO 法 (DynaL RELI)

6 施設中 1 施設 (23D24) のみ HLA-C および DQB1 を実施されているが、SSP との併用であり、1 部結果が記載されていない個所があった。また同施設の H2301 の C ローカスで発色が弱いプローブがスコア : 1 であったため、ミスアサインとなり、DRB1 は H2302・H2304 が誤判定であった。その他の施設についてはとくに問題ない結果であったが、

一部に別キットによる判定と思われる結果を記載した施設があった。また、ambiguity が少し異なるのはロット No. が全施設で異なるためと考えられた。

### 3. SSP 法

今回 SSP の結果を提出した施設は 20 施設であったが、そのうち 5 施設は SSP を補助として使用していた。使用キットの種類は 6 種類であり、そのうち 13 施設が Micro ssp JPN (OneLambda 社)、3 施設が Micro ssp を使用していた。その他は Micro ssp 1L/2L、補助として Micro SSP Specific, SSP Unitray, All Set Gold SSP である。

SSP を補助として使用した施設の目的は、別方法による判定結果の確認のためであると思われるが、1 アレルごとにアレル特異的なキットを使用するのは日常的ではないため、今後の DNA-QC については提出方法を検討した方が良いと思われた。

使用頻度が一番高かった Micro SSP JPN は日本人に限られたタイピングでは判定が容易と考えられるが、1 ウェルのみで決定される抗原型が、今回のサンプルだけでも 9 種類 (A24・A31・A3・DR1・DR7・DR15・DQ3・DQ5・DQ6) あるため、1 ウェルの反応不良でも 1 抗原を見落とす可能性があり、注意しなければならない。

これによる誤判定は 23D27 の A24 および DQ5、

また Micro SSP ABDR でも 23D02 の DR7 が見落とされた。一方、false negative が 1～4 箇所認められた施設は他に 6 施設あったが、判定に影響がなかったようである。これについてはスコアの記載ミスによるものか、別の方法で確認された結果であったのかは不明である。

また、SSP は本来 low resolution の検査が目的で作製されたキットであったため、2 桁の判定でも良いとされてきたが、4 桁で誤判定になる場合を考えると、今後どちらかに統一するべきかもしれない。

#### 4. 結果報告と表記

SSP のアレル判定に抗原型を記載している施設があった (23D57)。今回が初めての参加であるかは不明であるが、抗原型としては間違いではないのに、抗原型と遺伝子型を混同しているような記載も含まれていた。また、23D59 の施設はアレル表記に

アステリスク (\*) が記載されていなかった。その他は C ローカスのアレル表記が Cw となっているもの、第 2 区域の 2 桁に L・N 付記されているものがあった。

また、方法別のアレル判定シートに、別方法の判定を含めた総合判定と思われる結果を記入した施設もあり、同一キット同一ロットであるのに、あるべき ambiguity が無いなどの差異が見られた。

#### 5. おわりに

日常業務に追われる中での HLA-QC であるので、QC 担当者からのメールなど、見落とすこともあると思われる。日本人由来のサンプルであるなど、見落としていけば簡単には結果が出せないの、注意事項など見落とされないような工夫が必要であるかもしれない。

## 第 15 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 結果の表記法—

橋口 裕樹

福岡赤十字病院

#### 1. 概要

今回、第 15 回 QCWS の参加施設は 51 施設であり結果の表記は A, B, C, DRB1 を評価対象とし DRB3/4/5, DQB1, DPB1, DQA1, DPA1 は評価対象外とした。ローカス別の参加数は A, B, DRB1 が全 51 施設 (100%) C は 39 施設 (76.4%) であった。今回の解析は“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)”をもとに評価を行った。表記法の主な改箇所を下記に示す。

##### 1) 改訂箇所 (1)

「II. アンビギュイティ (ambiguity) の結果表記

について」の「2. 第 2～4 区域で判別できないアレルが複数存在する場合の表記」について、以下の改訂を行う。

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

## 2) 改訂箇所 (2)

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

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

例：HLA-DRB1\*04:03/05/06/+ と判定された場合は、「HLA-DR4」と表記し、HLA-A\*02:06/10/21/+ と判定された場合は、「HLA-A2/210」と表記する。

## 3) 改訂箇所 (3)

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

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

## 2. 結果

DNA 表記は、全て 90% 以上の正解率であった。HLA 型表記は正解率が 90% 以下の箇所が 8 ヶ所あり、表記に不備が目立った。

表 1. 主な DNA 型表記での減点対象例

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

表 2. 主な HLA 型での減点対象例

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

## 3. 考察

今回は、特に HLA 型表記の間違えが目立つ形となった。ローカス別では、C ローカスは前述した改訂箇所 (3)、B ローカスは改訂箇所 (2) の表記方法での誤りが多かった。再度、“HLA タイピング結果のアリル表記法と結果報告の原則 (2010 年度版)” を熟読されて、正しい表記での報告をお願いしたい。

# 第 15 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 FlowPRA 法—

石塚 敏

東京女子医科大学腎臓病総合医療センター移植免疫研究室

## 1. 概要

今回、FlowPRA 法では、全施設から Negative Control と Sample の FCS ファイルの提出をお願いし、統一した条件設定による解析が可能になった。

FlowPRA 法の検査状況の解析について詳細な集計データ等は、MHC 誌紙面の都合上、学会ホームページに記載されている概要資料を参考にして頂きたい。

## 2. FlowPRA 法の検査状況

FlowPRA Screening IgG test の実施施設は、HLA Class I 抗体：21 施設、HLA Class II 抗体：20 施設（内訳は、輸血関連 13、臓器関連 14、造血関連 7: 重複施設を含む）であった。

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

FlowPRA Single Antigen IgG test の実施施設は、HLA Class I 抗体：3 施設、HLA Class II 抗体：3 施設（内訳は、輸血関連 3、臓器関連 4、造血関連 2: 重複施設を含む）であった。

使用機器は、ベクトン・ディッキンソン 11 施設、バックマン・コールター 10 施設であった。

## 3. FlowPRA Screening IgG test 解析結果

今回、配布された 4 種類の Sample は、すべて HLA Class I & II 抗体共に陽性であった。参加施設から報告して頂いた判定スコアは、一致率 100% で結果の乖離を示した施設はなかった。

陽性率 % は、1 施設において HLA Class I & II 抗体共に極端に陽性反応が鈍い施設があった。データ提出用ファイルに添付されているヒストグラム、また FCS ファイルから Control Besds 等を参照すると問題が無いと考えられることから、Positive Control または Anti-Human IgG-FITC の力価の確認が必要である。

## 4. FlowPRA Screening IgM test 解析結果

配布された 4 種類の Sample は、HLA Class I 抗体がすべて陰性であると推測されるが、1 施設で陽性判定があり、そのため一致率 66.7% となり結果の乖離を生じた。

結果の乖離した施設のデータ提出用ファイルのヒストグラム、また FCS ファイルから Control Besds 等を確認したところ問題が無いと考えられたため、解析法による相違であることが推察された。

## 5. FlowPRA Single Antigen IgG test 解析結果

データ提出用ファイルの図を確認すると、Negative Control の初期設定が各施設で若干異なっていた。また、施設によってはメーカー純正の Negative Control serum ではなく、自家製 Negative Control serum を使用しており、明らかにデータの相違が認められた。今後、使用機器に対して Calibration Beads などによる初期設定の確認と Cut-off の設定基準が必要であると考えられる。

## 6. まとめ

今回、FlowPRA 法の解析では、全施設の FCS ファイルを統一した条件設定にて再解析を実施すること

が出来た。

再解析することにより非特異的反応を見極める Control Beads や解析に使用したビーズ数を確認する

ことがより可能になった。

来年度は、Positive Control についてもデータ提出用ファイルに添付出来るようにしたい。

## 第 15 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—

宮崎 孔

北海道赤十字血液センター

### 1. はじめに

LABScreen は Mixed, PRA, single antigen (LS-SA) の 3 種類の試薬があるが、今回のワークショップでは Mixed が 5 施設、PRA は class-I, -II 共に 3 施設、LS-SA class-I は 20 施設、class-II では 17 施設の参加となった。全 22 施設中 20 施設で同一 Lot の LS-SA (class-I) が使用されていたため、LS-SA 中心にデータの解析を行った。解析のポイントは次のとおりである。

- 1) LS-SA での個別の HLA 抗原に対する判定結果は、全施設の結果の 2/3 以上一致を consensus として評価し、consensus が得られない抗原は判定保留とした。
- 2) 施設間の不一致が多かった HLA 抗原については蛍光値 (Baseline Normalized Value: BNV) の分布について解析を行った。
- 3) 各施設の BNV 平均値のバラツキ (シフト) について解析を行った。

なお、結果の詳細は学会ホームページの「第 15 回 QCWS 解析報告集」を参照いただきたい。

### 2. 結果の解析および考察

SH2301 ~ SH2304 の HLA 抗体の有無 (総合結果) は全ての施設が正解であった。LS-SA での HLA 抗原別の判定では、consensus が得られた抗原では全 20 施設でほぼ一致した結果が得られた。一方、

class-I では 11%、class-II では 14% の抗原で施設間の乖離が認められた。

#### 2.1 cutoff の設定について

施設間の乖離が多い HLA 抗原での全施設の BNV の分布に注目すると、LS-SA の cutoff 付近と考えられる 500 ~ 1000 付近に分布していた。例えば BNV=800 を示す弱い反応の場合は cutoff を 500 としている施設では陽性、cutoff を 1000 としている施設は陰性と判定するため、施設間の乖離が多くなるものと考えられる。Cutoff の設定は本来その施設でのデータを元に検査目的に合わせて設定するものであるが、最近では LABScreen で陽性と判定しても移植や輸血の成績に影響しない例も報告されているため、十分な注意が必要である。自施設での臨床データを元に高い cutoff を設定した場合、本 QCWS で設定した consensus との乖離が多くなり施設評価が低くなる可能性がある。しかし、その施設での抗体検査結果と臨床データの相関が高いのであれば、むしろそちらの方が検査目的に合った実際的な正解であるとも考えられる。

#### 2.2 各施設での平均蛍光強度の差異

各施設の全データの中から明かな陽性反応 (BNV>2000) を示したビーズだけの BNV 平均値を施設毎に求めて比較すると、全施設の BNV 平均値

±2SD を外れる施設がいくつか見られた。これらの施設は LS-SA に含まれる positive control beads の BNV で比較しても、同様に全施設の BNV 平均値 ±2SD を外れる傾向にある。平均蛍光値が高くシフトしている施設 (Luminex) で cutoff を低く設定すると、結果の乖離 (偽陽性) がより増える結果となってしまう。Luminex の蛍光値が全国平均から外れている施設においては、再度キャリブレーションを実施することを勧める。なお、それでも改善が見られない場合は検査プロトコルの再確認、あるいは QCWS のデータを元に cutoff を再設定する必要もある。

### 2.3 その他の判定不一致

その他の判定結果の乖離の原因として、特定のビーズだけの実測値の異常、実測値と判定が明らかに異なる判定 (転記) ミスがいくつか認められた。LS-SA ではデータ数が膨大になるため、データ解析は慎重に行い、適切なデータ確認操作も必要になる。

さらに判定不一致の原因として、アレルによって反応性が異なる場合がある。SH2302 は DRB1\*01:01, \*01:02 陰性, DRB1\*01:03 陽性となる検体であるため、DR103 陽性と明記しない場合は DR1 に対する判定は陽性とするべきである。しかし、全施設で同じ反応性を示したにも関わらず、「DR1 陰性, DR103 コメント無し」とした施設が見られた。このようにアレルによって反応が異なる場合は、少なくとも判定保留として陽性扱いするべき

である。

### 3. まとめ

LABScreen による HLA 抗体スクリーニングの結果は全施設正解であった。抗体特異性に関しては施設間の乖離がいくつか認められ、その原因の多くは各施設での cutoff 設定による弱陽性反応の判定の違いによるものであった。弱陽性反応や突発的な異常反応については、複数のアレル、CREG の反応などエピトープを考慮して抗体特異性の判断を行うと判定の精度は向上すると考える。また、施設 (検査目的) によって cutoff が異なる可能性があるため、LS-SA にとっての本 QCWS の活用法は、各抗原に対する判定の一致よりも自施設の BNV が他の施設と比べて大きく外れていないことを確認することが重要となるかも知れない。

HLA 抗体検査は LABScreen と FlowPRA が主流となっているが、年々 LABScreen (特に LS-SA) が増えており、今回の LABScreen に参加した全 22 施設のうち LS-SA を実施していないのは 2 施設だけである。このように LS-SA は現在の HLA 抗体特異性同定のスタンダードとなっているが、臨床成績との乖離、自然抗体様の反応 (偽陽性?), 血清検体による偽陰性などの問題もある。従って正しい結果を導き出すためには FCXM 等のダイレクトクロスマッチとの組み合わせが理想的である。

## 第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート — 検査法別解析 抗体検査 (追加発言) — 抗体検査におけるプロゾン様現象について

### 1. LABScreen Single Antigen とプロゾン様現象 黒田ゆかり (日本赤十字社九州血液センター)

2010 年 9 月日本血液事業学会において、岡山県赤十字血液センターの平田氏らによって他方法との

結果の乖離から、LABScreen Single Antigen においてプロゾン様現象が起きることが報告された。その後、我々はこのプロゾン様現象について検討した結果、プロゾン様現象が非働化によって抑制さ

れることを見出し、プロゾーン様現象への補体の関与について2011年2月日本組織適合性学会近畿地方会で報告した。

今回、QCWSの検体(class I)においてこの現象の有無を確認したところ、蛍光値に差が見られた検体が存在した。SH2301では56°C 30分の熱非働化後にいくつかの抗原ビーズで蛍光値が10,000程度高くなったが、このSH2301を含む全ての検体においてプロゾーン様現象の影響による陰性陽性判定の乖離は無く、QCWSへの影響は無かった。

新鮮血清を用いた場合、LABScreen Single Antigenではプロゾーン様現象によって蛍光値が大きく変動する可能性があることから、統一した対応策が望まれる。

## 2. 抗体検査におけるプロゾーン様現象

藤井直樹, 小島裕人, 佐治博夫 (特定非営利活動法人 HLA 研究所)

### 1) はじめに

抗原抗体反応において、抗体過剰のために反応が抑制されることをプロゾーン現象という。Luminex法におけるHLA抗体検査で類似の現象が見られ、EDTA処理により改善されることが報告されている<sup>1,2,3)</sup>。そこで、今回QC検体でEDTA処理をすることによりこの現象に関する検討をおこなった。

### 2) 検査方法

Luminex 法

- LABScreen Single Antigen (One Lambda) (SA)
- LABScreen PRA (One Lambda)
- WAKFlow HLA 抗体クラス I/クラス II (MR) (湧永製薬)

### 3) 結果

EDTA処理の有無により、MFI (Median Fluorescence intensity) 値に大きな差がみられた検体はPRAではSH2301, SAではSH2301, SH2302, SH2303である。Class IIではPRAでSH2302, SH2303で、SAではSH2302, SH2304である。例えば、SH2301のClass I (SA) ではB\*49:01のMFI値は血清で10,158, EDTA処理後で23,051, SH2304のClass II (SA) ではDQB1\*03:01のMFI値は血清で19,996, EDTA処理後で28,252であり、EDTA処理後のMFI値が高

い抗体ほど大きな差がみられた (ホームページ掲載図1, 図2)。

WAKFlow HLA 抗体クラス I/クラス II (MR) の検査では、MFI値に大きな差はみられなかった。

### 4) 考察

今回の結果はMFI値の高い抗体ほどEDTA処理前のMFI値が低値であり、プロゾーン様現象といえる。陽性判定が陰性化する検体はなかったが、抗体過剰の検体ではプロゾーン様現象がおきることにより、DSA (Donor Specific Antibody) を見落とす可能性がある。そのため、検査には血漿検体を用いるのが望ましいが、血清検体を用いる場合はEDTAを加えて検査したほうが良い。とくに経時的な抗体価の推移を見るときに留意が必要である。

WAKFlow HLA 抗体クラス I/クラス II (MR) においては、プロゾーン様現象は確認されなかったが、当研究所ではLS同様にこの現象が確認された検体もあり、キットの特性によるものではないと考えられる。

## 参考文献

1. Lowe D, Hathaway M, Briggs D. The high-dose hook effect in the detection and monitoring of HLA specific antibody by Luminex assay. *Int J Immunogenetics* 2007; 34: 288.
2. Kosmoliaptsis V, Bradley JA, Peacock S, et al. Detection of immunoglobulin G human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is compromised by the presence of immunoglobulin M human leukocyte antigen-specific alloantibodies. *Transplantation* 2009; 87: 813.
3. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads—a technical solution for the prozone effect. *Transplantation*. 2011 Sep 15; 92(5): 510–515.

## 3. 抗体QCサンプルに関するコメント

中島文明 (日本赤十字社中央血液研究所)

抗体サンプルの選定にあたっては、テーマに基づ

いて通常検出する特異性かつ明確な反応を示す血清を採用している。具体的には、① LCT 特異性から選択する、②各 HLA 抗体検査法で確認する、③高バックグラウンド、非特異反応の有無を確認する、④ Ig isotype の確認をして配布している。非働化によるシグナルの変化も確認しており、特異性として問題ないレベルであることも把握している。

これらは、蛍光値自体は大きく改善されているよ

うに見えるが、コントロールと比較した比率では大きな差はない。日常の検体で観察されるプロゾーン様現象は、特に補体結合性抗体で認められるため、その重要度は無視できない。しかしながら、QCWS サンプルはそのような影響を受けない血清を配布しており、今回のデータで、測定期間中にシグナルが変化した形跡も認めなかった。

## 第 15 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—

平田 康司

岡山県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 WAKFlow-MR）は 12 施設が使用し、その内 8 施設はクラス I と II 両方、4 施設はクラス I のみの使用であり、前年度に比べ使用施設数が少し増加した。試薬ロットはクラス I：4 種、クラス II：3 種の使用であった。非特異反応吸着処理として WAKFlow-MR 専用の血清処理試薬は、クラス I：8 施設、クラス II：6 施設で全サンプルにおいて使用されていた。（HP 掲載：表 1）

#### 1.2. 結果と考察

##### 1) 各ビーズの反応性の比較

WAKFlow-MR は、陰性対照血清および被検血清において精製 HLA を結合した各 HLA ビーズおよびバックグラウンドビーズの蛍光 Median 値より Index 値が算出され、その Median 値および Index 値によってカットオフ値が設定され、各 HLA ビーズにおける抗体反応性が判断される。

クラス I では、SH2301 および SH2303 のように

陰性・陽性反応ビーズが比較的明確に区別できるサンプルでは僅かな施設間差（血清前処理の影響を含む）および試薬ロット間差は抗体反応性の判断にはほとんど影響がなかった（HP 掲載：図 1 および図 3）。しかしながら、SH2302 および SH2304 では抗体有無（HP 掲載：表 2）および Index 値が高値を示す HLA ビーズの抗体反応性：陽性の判断には問題はないが、Index 値が低値を示し明確に陰性・陽性判定できない HLA ビーズにおいては僅かな施設間差および試薬ロット間差が抗体反応性の判断に影響しているようであった（HP 掲載：図 2、図 4 および図 9）。一方、クラス II ではパネルの抗原性解釈（DP 抗原等）より判定に相違がみられるが、施設間差および試薬ロット間差がほとんどみられず、抗体反応性の判断に施設間で乖離はほとんどなかった（HP 掲載：図 5～図 8 および図 10）。

##### 2) 各サンプルの抗体特異性について

WAKFlow-MR は、抗体と反応を示さない「許容抗原」を決定する検査法として HLA ビーズパネルは構築されているため、各施設からの WAKFlow-MR の抗原別抗体判定よりコンセンサスを導き

WAKFlow-MR で判別可能な許容抗原を示した (HP 掲載: 表 3)。また, 抗体特異性が同定できたものについては合わせて示した (HP 掲載: 表 3)。

クラス I-SH2301 は, HLA-A24, Bw4 および B15 関連と反応を示すサンプルであり, WAKFlow-MR でも HLA-A24, Bw4 をもつ HLA ビーズとは反応を示していた。一方, B15 関連である B75 をもつ HLA ビーズとは反応がみられなかった。クラス I-SH2302 は, HLA-A24 以外の A ローカスと反応を示すサンプルであり, WAKFlow-MR でも HLA-A24 には反応がみられなかった。しかしながら, HLA-A1, A2 および A3 の反応性については施設間で乖離がみられた。クラス I-SH2303 は, WAKFlow-MR において 2 種 (ないしは 1 種) の HLA ビーズ以外に対して強い反応性を示すサンプルであり, 抗体特異性を明確にすることは困難であった。クラス I-SH2304 は Cw および B ローカスに対する抗体を複合して有するサンプルで, 前述 1) の項で示したように WAKFlow-MR では陰性・陽性判定が容易でないサンプルではあるが HLA-Cw4, Cw6 および B62 を有する HLA ビーズには反応を示しているようであった。一方, HLA-Cw15 および B75 を有する HLA ビーズとは反応がみられなかった。クラス II-SH2301 は, HLA-DR1, DR7, DR9, DR10, DR16 および DQ6 を有する HLA ビーズと反応することが確認されたが, DQ5 を有する HLA ビーズとは反応がみられなかった。クラス II-SH2302 は, HLA-DR8, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR16 および DR17 を有する HLA ビーズと反応することが確認された。クラス II-SH2303 は, DR1, DR4, DR9, DR11 および DR14 を有する HLA ビーズと反応することが確認された。一方, HLA-DR7, DR15 および DR17 等その他の抗原については他の検査方法と反応性に乖離がみられるものがあった。クラス II-SH2304 は, HLA-DR4, DQ7, DQ8 および DQ9 を有する HLA ビーズと反応することが確認された。

以上より, WAKFlow-MR は本 QC サンプルにおいて HLA 抗体の有無を正しく判定することができた。また, WAKFlow-MR は「許容抗原」を決定する検査法として有用であり, ある程度抗体特異性を

同定あるいは推定することもできる。クラス I においては, LABScreen Single Antigen において検出される HLA-A および B ローカスに対する抗体で蛍光値 BNV4,000 ~ 5,000 以上の反応性を示すものを概ね検出することができるのではないかと推察される。

## 2. ICFA 法

### 2.1. はじめに

ICFA 法は 5 施設が使用し, その内 3 施設がクラス I のみで 2 施設はクラス I と II 両方の使用であった。前年度の 8 施設より 3 施設減少した。各施設における使用パネル数から, パネルスクリーニングおよび (他法で得られた抗体特異性の) 反応性の確認目的で使用されているようであった (HP 掲載: 表 4)。

### 2.2. 結果と考察

実施施設からの Raw data が十分でなかったため, 各サンプル血清に対する細胞反応性について各施設でデータシートに入力された測定値 (スコア) をもとにセログラフを作成し, ICFA 法の評価・解析を行った (HP 掲載: 表 5)。なお, class II については, データ数が少なかったため参考データとする。

クラス I-SH2301 は, HLA-A24, Bw4 および B15 関連との反応がみられたが, B15 関連である B71, B75 および B35 との反応は弱かった (HP 掲載: 図 11)。クラス I-SH2302 は HLA-A24 以外の A ローカスと反応性を示すサンプルであるが, ICFA 法では A1, A2 および A3 との反応は弱いもしくは陰性であった (HP 掲載: 図 12)。クラス I-SH2303 は 1 パネルを除きほとんどのパネルと強い反応がみられ, パネルスクリーニングである ICFA 法で抗体特異性を同定することは困難であった (HP 掲載: 図 13)。クラス I-SH2304 は HLA-Cw4, Cw5, Cw6 および Cw15 に加え, B15 関連等の B ローカスにも反応性を示すサンプルで, ICFA 法においてもこれらの抗原と反応がみられた (HP 掲載: 図 14)。一方, クラス II-SH2301 では DR1, DR15 および DQ5 (HP 掲載: 図 15), クラス II-SH2302 では DR3, DR11, DR12, DR13, DR14 および DR8 (HP 掲載: 図 16), クラス II-SH2303 では DR4 (weak) (HP 掲載: 図 17), クラス II-SH2304 では DR4 (HP 掲載: 図

18) と反応することが ICFA 法で確認された。

以上より、ICFA 法は WAKFlow-MR と同等以上の HLA 抗体の検出感度を有しており、また LABScreen Single Antigen において検出される HLA-A および B ローカスに対する抗体で蛍光値

BNV 4,000 ~ 5,000 以上の反応性を示す抗体を概ね検出することができた。生体試料である血液を用いる ICFA 法はクロスマッチの検査法として適しており、検出された抗体の生体反応性および臨床的意義を評価する上においても有用である。

## 第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 その他検査法およびクロスマッチ—

中島 文明

日本赤十字社 中央血液研究所

### 1. その他検査法

その他検査法は、LCT(AHG-LCT)1 施設、MPHA5 施設、LIFT2 施設の参加であった。総合判定の抗体検出状況は、どの方法も問題ない。ただし、多くの施設は FlowPRA や LABScreen などを併用している。抗体特異性について、LCT 及び LIFT は抗原種類の充実度に依存した結果であった。一方、MPHA キットでの HLA 抗体特異性決定はほぼ不可能であった。

これらの検査法に共通する問題は抗原種類の確保と維持であり、抗体検査法としては近年の精製抗原試薬の方が遥かに優れている。しかし、クロスマッチにこれらの手法は必要不可欠であり、その技術水準の維持を期待したい。

### 2. クロスマッチ

クロスマッチは昨年から試行導入し、ダイレクトクロスマッチに加え仮想クロスマッチも実施した。

ダイレクトクロスマッチは、抗体サンプル (SH2301) を指定し、抗原細胞は各施設が準備し、LCT1 施設、LIFT3 施設、ICFA8 施設の参加であった。判定結果のグレーゾーン部分を解析すると、LCT

は検出感度に応じて幾つかの抗体反応が不十分であった。抗体検査結果とクロスマッチ結果の比較では、B55、Cw1 などでクロスマッチの偽陰性化が認められ、抗体検査とクロスマッチの検出感度の不整合が原因と考えられる。

仮想クロスマッチは、一つの抗体サンプル (SH2301) に対して、二つの HLA 型 (H2301, H2302) を指定した。抗体特異性が明確であり結果に問題は生じなかった。今回の QC ワークショップの参加状況では、仮想クロスマッチ参加の 6 施設以外に、18 施設が DNA-QC と抗体 QC に参加しているので、次年度以降の参加を望みたい。今後は、タイピング結果に抗原グループの Ambiguity が存在する場合、抗体特異性が不明瞭な場合にどのように判定すべきか検証できる組合せも考慮したい。

ダイレクトクロスマッチは手技を含めた判定解析、仮想クロスマッチは DNA と抗体 QC 結果の正確性から派生する判定解析が検証点であるが、部門の方向性に応じた解釈も要求されるであろう。最終的には施設認定の重要な要素となることを目指すべきと考える。

# 第 15 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、51 施設の参加があり、震災の影響及び一部の試薬が供給停止になったことで、参加施設数は昨年より減少した。輸血部門 27 施設、臓器移植部門 32 施設、造血幹移植部門 17 施設、その他 5 施設であり、うち 21 施設で重複がみられた (図 1)。

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

## 1. 使用タイピング法について

何れの部門でも Luminex 法 (蛍光ビーズ法) が一番多く使用されていたが、使用比率で見れば、SSP 法または RELI は、臓器移植部門での使用比率が高かった (表 1)。また、各タイピング法の参加部門別の占有率は、RELI が臓器移植部門で 100% を占めていた (表 2)。

各タイピング法で、タイピング対象となった HLA 座を表 3 に示した。何れのタイピング法においても、HLA-A, B, DRB1 座は 100% 実施されていたが、HLA-C 座については、RELI 使用施設 (6 施設) での実施率は 17% と低く、SBT 法では 100% であった (表 3)。

## 2. 結果評価

### 2.1. 概要

これまで QCWS 結果報告は、結果の状況を報告するだけであったが、昨年より、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 項目の評価を試行的に行った。今回から「HLA-QC ワークシ

ョップ結果評価の基準」に従い結果の評価を行った。

### 2.2. 判定結果の評価

判定結果の評価は、基準にもあるように①「各 HLA タイピング法での判定結果が妥当であること」、②「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、各タイピング法別、検体別、タイピング実施座別に、両方の基準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、最終的には各評価点の平均点をその施設の評価点とした。

今回の QCWS の「判定結果」の評価点は、平均で 54.8 点 (図 2 参照) であり、昨年の 56.7 点より低くなった。タイピング法別では、SSO/SSP 法での評価点が、14thQCWS では 57.3 点であったのに対し、15thQCWS では 53.4 点であった。この点については、SSO/SSP 法を使用した低解像度のタイピングでの結果表記に問題があり、結果的に評価点が下がるケースが見受けられた。今後、低解像度での HLA 抗原型をタイピングした際の、結果表記の在り方を明確にする必要がある。

### 2.3. 結果表記の評価

2010 年 4 月から HLA アリルの命名規則が変更となり、当学会では「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)」(以下、表記法) により新表記法に対応を行った。昨年より表記法の問題点について指摘があり、3 ヶ所 (①第 2 区域で判別できないアリルが複数存在する場合の表記する順番について、② DNA タイピング結果から複数の HLA 型の可能性がある場合の結果表記法

について、③ HLA-C 座の HLA 型が不明な場合 (HLA-C\*12 ~ C\*18) の HLA 型表記について) について改訂を行った。

結果表記の評価基準は、「表記法に従って記載されている」ことを評価基準としており、参加全施設の評価点の平均点は、今回の QCWS で 38.5 点 (図 3 参照) であった。前回の QCWS の平均点は 37.3 点であり、今回の QCWS の方が高くなり、徐々に表記法に従った記載が増えて来ている。また、表記法の問題点等については、本稿の「検査法別解析—DNA タイピング—結果の表記法」で紹介されているが、「ローカス名記載」、「\*」の表記、「HLA-C 座の HLA 型の表記」等に間違いが多く見られた。

### 2.3. 総合評価

「判定結果の評価点」と「結果表記の評価点」の合計点の分布を図 4 に示した。平均点は 92.8 点であり、昨年 of 平均点 94.0 点より低かった。総合的

な判定区分として、判定結果と結果表記の評価点の合計から、100 点を“A:良好”, 60 ~ 100 点未満を“B:要確認”, 0 ~ 60 点未満を“C:要改善”と区分して評価し、A 評価が 13 施設、B 評価が 36 施設、C 評価が 2 施設であった (図 4)。

試験・検査状況の評価については、「HLA タイピング実施時に得られた試験結果 (データ) が適切であること、また判定が適切に行われていること」を評価しており、①試験結果が全て妥当である場合を“A”, ②反応データの一部に不備がある場合を“B”, ③反応データのほとんどが不備である場合を“C”と判定している。各方法別の評価結果の分布を表 4 に示した。SSP 法で“B”として評価された割合が高くなった。

以上、施設別の結果の評価が各施設での検査法の改善に繋がれば結果の評価も意味があると考えているが、まだまだ改善の余地が必要である。

## 第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート —部門別解析および結果評価 (抗体部門)—

高 陽淑

大阪府赤十字血液センター

### 1. 部門別解析

#### 1.1. 概要

抗体検査の参加は、輸血部門 24 施設、臓器移植部門 22 施設、造血幹細胞移植部門 15 施設 (全て重複あり) で昨年より 3 施設少ない 38 施設であったが、部門別参加の割合および参加施設の構成比率については大きな変動はなかった。

また、抗体検査実施状況については、38 施設中 36 施設 (94.7%) が蛍光ビーズ法を応用した方法を実施し、使用試薬の目的調査から、抗体検出には

FlowPRA が 21 施設 (58.3%), LABScreen が 8 施設 (22.2%), WAKFlow が 7 施設 (19.4%) で用いられたことが判明した。一方、抗体特異性同定 (28 施設が実施) には 20 施設 (71.4%) が LABScreen single antigen を採用しておりこの試薬が広く用いられていることが伺えた。また、昨年同様に試薬の使用状況が特定の部門に偏らない「均一化傾向」も認められた。

## 1.2. 部門別解析

部門別に、抗体特異性同定の実施率を比較すると、Class I 抗体では造血幹細胞移植部門 86.7%、輸血部門 83.3%、臓器移植部門 68.2% であり、Class II 抗体では造血幹細胞移植部門 73.3%、臓器移植部門 59.1%、輸血部門 50.0% となった。殆どの施設は複数部門に参加しているため厳密には言えないが、各部門における抗体特異性の重要度を反映している結果と考える。

## 2. 結果評価

### 2.1. 抗体 QC 結果評価に対する考え方

正解が決定できない抗体検査において、公平に評価するための基本理念は以下の①～③で、評価の対象は各施設の「総合判定結果」とし、一定の評価基準に基づく三段階評価 (A.B.C) とする。

- ①参加施設の結果をデータベースとすること
- ②一定の水準を満たしている事
- ③サンプルの内容 (性状) に左右されないこと

また、各サンプルの結果に対する評価は、参加施設から提出された結果が共通となる割合を表した「基準値＝現段階では 0.67 (2/3)」を基に、それ以上の構成比率を示す抗原 (サンプル) を対象として実施した。よってそれ以下の構成比率を示す抗原 (判定結果が施設間でとまらない抗原) は対象外となる。

また、検査の実施環境や目的が異なるすべての参加施設が検出可能な抗原を対象にするべきという観点から、現段階では日本人遺伝子頻度 0.1% 以上の抗原を評価の対象としている (詳細な評価点基準設定の根拠および算出法については HP 掲載の解析結果を参照)。

### 2.2. 評価内容

- 1) 抗体検出については 37 施設 (97.4%) の結果が A 評価 (80 点以上) となり全体的に良好な成績ではあったが、今回は抗体有無の判定が比較的容易なサンプルであったことを考えると、参加施設の完全一致が望ましい。
- 2) 抗体特異性同定検査においては評価 A が 19 施設 (67.9%) であるのに対し、評価 B が 7 施設 (25.0%) 評価 C が 2 施設 (7.1%) となった。こ

れを部門別に解析すると、3 部門間の平均評価点には大差を認めないが、輸血部門においては部門内施設間の評価点にバラツキを認めた。また、サンプル別に部門ごとの平均点を比較してみたが、サンプルに偏りはなく全体的に輸血部門の平均点が低いことが判明した。

- 3) 各抗原における未検査および陰性が判定できない保留 (評価 0) が全く存在しない施設は Class I においては 20 施設 (71.4%)、Class II においては 17 施設 (77.2%) と大半を占めている一方で、対象抗原の 50% 以上が未検査あるいは保留 (評価 0) としている 3 施設はすべて輸血部門であった。
- 4) また、輸血部門では抗体特異性同定を判定する際にも、MPHA 法や LCT, AHG-LCT 法など 40 種類 (Class I) 前後の HLA 抗体を判別することは困難な検査法を採用している施設があった。以上を総合的に考えると、輸血部門では「抗体特異性同定の必要性」に施設間差があるのかもしれない。
- 5) 抗原毎の共通となる結果を対照として、各施設の結果の一致状況を検討した。

結果が不一致となるパターンから推測できる要因としては、判定の Cut off 値が他施設と比較して高い (あるいは低い) 設定になっている場合と判定基準そのものが不安定である場合などが考えられるため、不一致率の高かった施設においては再確認を願いたい (詳細は HP 掲載の解析結果を参照)。

### 2.3. 14QCWS に関するアンケートについて

14QCWS でのアンケートにおいて、特に現在の「評価基準が不適切」と判断された施設のご意見に対して回答した内容を HP に掲載したので参照されたい。これらのご意見については、全体的な水準を考慮しながら評価の方法などに反映していくものと思われる。

## 3. 結語

15QCWS の結果からは、14QCWS の結果と比較して全般的には評価点の上昇および施設間差の減少

が伺える。このことは参加施設の努力によって全体的な水準が上昇したこともあるが、採用する検査法が高感度な方法に集約されてきた事も反映していると考えられた。

これまでのように、各施設が用いる抗体検査の原理も検出感度も様々であるような状況、あるいは輸血では Luminex 法、臓器移植ではフローサイトメトリというように部門で採用する方法に偏りがある状況では、検査の目的を同一にする部門毎に解析・評価することが妥当であると考えられた。しかし、今後はますます採用する検査法が参加施設全体で集

約・均一化されていくことを考慮すると、むしろ病院などの医療機関、血液センター、研究施設や試薬メーカーなど、施設別に整理し評価することも検討する必要があると考える。

QCWS の本来の目的は自施設での検査結果の精度および判定基準等について再確認し、参加目的とその到達度を自己評価することにある。最終的には「施設認定」の評価に繋がっていくことから参加目標が単に「評価点をあげること」にならないよう認識することが重要である。