

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過およびサンプルの総合結果—

田中秀則¹⁾, 中島文明¹⁾

日本組織適合性学会 組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会[#]

¹⁾ 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

1. ワークショップの経過

平成 26 年 1 月に QCWS 開催及び参加申込みの案内を、学会誌および学会ホームページ（以下、学会 HP）に掲載し、平成 26 年 2 月までに 73 施設（DNA-QC:69 施設、抗体 QC:54 施設）からの参加申し込みがあった（表 1）。参加施設への連絡およびデータ収集は、電子メールで行った。

DNA-QC および抗体 QC に用いる試料の選択は、第 22 回大会会期中に開催した QCWS 部会で協議した基本的な方針に従って行った。また、各施設から提出された結果の解析は、検査法別と臨床部門別に解析を行うこととし、臨床部門（以下 4 部門、輸血、臓器移植、造血幹細胞移植、その他（研究等））については、参加申込書の記載に従った。

4 月 1 日に試料を発送し、4 月 10 日に QCWS 結果入力用のシートファイルをメールの添付ファイルとして参加施設に配布し、結果提出の締め切りを 5 月 10 日とした。最終的には 73 施設（DNA-QC : 68 施設、抗体 QC : 52 施設）から結果が提出された。5～6 月中に生データの取りまとめ、6 月 25 日に各解析担当者にデータが配布され、解析が行われた。各検査法別の解析結果を 7 月 20 日に締め切り、8 月上旬までの間、各検査法解析担当者間で解析結果の取り纏めについてメールでのディス

カッションを行い、解析結果の公表内容を統一化した。平成 26 年 8 月中旬までに、最終報告データを作成し、解析結果をホームページで公開し、参加者が必要に応じてダウンロード出来るようにした。また、解析結果は QCWS 集会での報告及び本学会誌（MHC）への掲載を行った。

2. QCWS のテーマおよび試料選択について

DNA-QC のテーマは、昨年同様①正確な DNA タイピングが出来ることおよび第 2 区域まで判定されること、② DNA タイピング結果の表記を正しく記述できること、③学会の表記法に従って正確に表記すること、④ DNA タイピング結果に対応した HLA 抗原型に正確に読替えること、⑤日本人集団における ambiguity となるアリの解説の 5 点とした。

また、試料については、前年度の QCWS 部会で協議した「日本人由来の細胞で高頻度に検出される HLA 型であること」、「日本人由来で稀な HLA アリルであること」の要件に合う細胞を 4 種類購入し、抽出した DNA の配布を行った。

抗体 QC のテーマは、①抗体検出が正確に行えること、②エピトープと許容抗原により正確な抗体特異性解析が行えること、③検査結果から導かれる総合判定結果を正しく報告できることの 3 点とし、テーマに沿った 4 検体

[#] 日本組織適合性学会 組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会員

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

¹⁾ 日本赤十字社中央血液研究所, ²⁾ 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, ³⁾ 東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室, ⁴⁾ 広島大学原爆放射線医学研究所血液・腫瘍内科研究分野, ⁵⁾ 信州大学医学部, ⁶⁾ 東海大学医学部生命科学, ⁷⁾ 日本赤十字社近畿ブロック血液センター, ⁸⁾ 名古屋大学移植免疫学寄附講座, ⁹⁾ 福岡赤十字病院, ¹⁰⁾ 日本赤十字社北海道ブロック血液センター, ¹¹⁾ 愛知県がんセンター研究所疫学・予防部, ¹²⁾ 長崎大学熱帯医学研究所, ¹³⁾ 国立病院機構大阪医療センター臨床検査部, ¹⁴⁾ 国立病院機構水戸医療センター臨床研究部移植医療研究室

表 1 第 18 回 QCWS 参加施設

(受付日付順)

1	熊本大学医学部附属病院	中央検査部	38	岐阜大学病院	検査部
2	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	39	中四国ブロック血液センター	検査一課
3	帝京大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター	40	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部
4	高知医療センター	SRL検査室	41	国立循環器病研究センター	臨床検査部 輸血管理室
5	がん・感染症センター 都立駒込病院	輸血・細胞治療科	42	株式会社 ベリタス	技術推進部
6	関西医科大学附属枚方病院	輸血・細胞療法部	43	沖縄県立中部病院	検査科
7	日本赤十字社 中央血液研究所	研究開発部	44	大阪府立急性期・総合医療センター	移植支援検査センター
8	九州ブロック血液センター	検査二課	45	虎の門病院	輸血部
9	獨協医科大学病院	臨床検査センター 遺伝子・HLA検査室	46	独立行政法人 国立病院機構 米子医療センター	臨床検査科
10	東海北陸ブロック血液センター	検査三課	47	社会保険中京病院	検査部
11	北里大学病院	臨床検査部 DNA検査室	48	国立病院機構千葉東病院	臨床検査科
12	静岡県立病院機構 静岡県立総合病院	検査部 輸血・細胞治療科	49	県立広島病院	臨床研究検査科
13	徳島大学病院	輸血・細胞治療部	50	東海大学	医学部基礎医学系 分子生命科学
14	株式会社ビー・エム・エル	第三検査部 ゲノム検査課	51	湘南鎌倉総合病院	検査部
15	株式会社 LSIメディエンス	遺伝子検査部 遺伝子分析グループ	52	近畿大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター
16	伊勢赤十字病院	臨床検査部 輸血検査室	53	株式会社 エスアールエル	遺伝子染色体解析センター 遺伝子検査課
17	富山大学附属病院	輸血・細胞治療部	54	関東甲信越ブロック血液センター	検査部 検査三課
18	鷹揚郷腎研究所 弘前病院	HLA検査室	55	名古屋第二赤十字病院	検体検査第二課組織適合検査室
19	大分県立病院	輸血部	56	広島大学病院	輸血部
20	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部	57	福岡赤十字病院	検査部 移植・輸血検査課
21	市立札幌病院	検査部	58	旭川医科大学病院	臨床検査・輸血部
22	JCHO仙台病院	統括診療部 臨床検査科	59	札幌北極病院	臨床検査科
23	株式会社 リプロセル	技術部	60	岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部 免疫血清検査室
24	愛媛県立衛生環境研究所	疫学情報科	61	秋田大学医学部附属病院	輸血部
25	国立病院機構 岡山医療センター	臨床検査科	62	京都府立医科大学附属病院	腎移植センター
26	近畿ブロック血液センター	検査部 検査三課	63	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部
27	金沢医科大学病院	北陸腎移植HLA検査センター	64	北海道大学病院	検査・輸血部
28	NPO法人腎泌尿器疾患研究所		65	株式会社 医学生物学研究所	品質保証部
29	東海大学医学部付属病院	診療技術部 移植免疫	66	公益財団法人 HLA 研究所	
30	公立大学法人 横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部	67	関東甲信越ブロック血液センター 埼玉製造所	品質部 検査三課
31	富士重工業健康保険組合 太田記念病院	臨床検査部	68	京都大学IPS細胞研究所	基盤技術研究部門
32	東京女子医科大学	中央検査部 移植関連検査室	69	筑波大学	消化器外科研究室
33	松江赤十字病院	検査部 輸血管理室	70	北海道ブロック血液センター	検査一課
34	湧永製薬株式会社	試薬・診断薬事業部	71	山形県立 中央病院	輸血部
35	東北ブロック血液センター	品質部 検査一課	72	株式会社 保健科学研究所	QAU
36	香川県立中央病院	中央検査部	73	株式会社 イムコア	マーケティング 遺伝子・移植検査
37	九州大学病院	遺伝子・細胞療法部			

を選択し、配布することとした。また、配布する検体は、「日本人に通常検出される抗 HLA 抗体」を保有する検体で、一部の試料では、HLA-C 座抗原に対する抗体、IgM 性抗体、HLA 以外の分子に対して非特異的な反応を示す場合もある。

また、交差適合試験については、本年も試行的に以下の 2 通り実施することで参加申込みの受付を行った。また、全血由来のリンパ球による交差適合試験は、日本移植学会との連携し QCWS で使用する試料（血清）を使用して行った。

- ① 配布した抗体 QC の検体と各施設で準備した細胞でのダイレクトクロスマッチ
- ② 抗体 QC 試料と DNA-QC 試料の測定結果による仮想クロスマッチ

3. 解析方法

検査法別解析は、DNA-QC では① Luminex (SSO 法)、

② イノリパ (SSO 法)、③ SSP 法、④ SBT 法 (次世代シーケンサーを用いた方法も含む) および⑤結果の表記法について、抗体 QC では、① FlowPRA 法、② Lab Screen、③ WAK Flow および ICFA 法、④ その他検査法およびクロスマッチの 4 法について解析を行った。

部門別解析は、各検査法別の解析結果から、各参加部門 (輸血・臓器移植・造血幹細胞移植) での検査実施状況の解析および「HLA-QC ワークショップ結果評価の基準」に従った提出結果の評価を行い、その状況について解析した。各解析分担項目と解析担当者 (所属) は、以下のとおりである。

- 1) タイピング結果解析
 - ・Luminex (SSO 法) について
九州ブロック血液センター 黒田ゆかり
 - ・イノリパ (SSO 法) について
東京女子医大 安尾美年子
 - ・SSP 法について

表 2 第 18 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	
H2601	A*26:01:01 A26	A*31:01:02 A31	B*46:01:01 B46	B*40:02:01 B61	C*01:03 Cw1	C*03:04:01 Cw10
H2602	A*02:07:01 A2	A*24:20 A24	B*46:01:01 B46	B*59:01:01 B59	C*01:03 Cw1	C*01:02:01 Cw1
H2603	A*03:01:01 A3	A*24:20 A24	B*44:02:01 B44	B*40:01:01 B60	C*05:01:01 Cw5	C*03:04:01 Cw10
H2604	A*24:02:01:01 A24	A*26:02:01 A26	B*52:01:01 B52	B*15:01:01 B62	C*12:02:02 Cw12 ※	C*03:03:01 Cw9

HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
H2601	DRB1*08:03 - DR8 -	DRB1*09:01/21 DRB4*01:03:01 DR9 DR53	DQA1*03:01/02/03 DQB1*06:01:01 DQ6	DQA1*01:03/10 DQB1*03:03:02 DQ9	DPA1*02:02/05 DPB1*05:01//+ DPw5	- - -
H2602	DRB1*09:01/21 DRB4*01:03:01 DR9 DR53	DRB1*04:05 - DR4 -	DQA1*03:02/03 DQB1*03:03/30 DQ9	- DQB1*04:01/05 DQ4	DPA1*02:02/05 DPB1*05:01//+ DPw5	DPA1*01:03 DPB1*02:01//+ DPw2
H2603	DRB1*13:01:01 DRB3*01:01:02 DR13 DR52	DRB1*15:02:01 DRB5*01:02 DR15 DR51	DQA1*01:03/10 DQB1*06:03:01 DQ6	- DQB1*06:01:01 DQ6	DPA1*01:03 DPB1*02:01//+ DPw2	DPA1*02:01 DPB1*09:01//+ DPw9 ※
H2604	DRB1*15:02:01 DRB5*01:02/08 DR15 DR51	DRB1*14:12:01 DRB3*01:01/11 DR14 DR52	DQA1*01:03/10 DQB1*06:01:01 DQ6	DQA1*05:03/07 DQB1*03:01:01 DQ7	DPA1*02:01 DPB1*09:01//+ DPw9 ※	DPA1*02:02/05 DPB1*05:01//+ DPw5

上段 (斜体): HLA 遺伝子型
下段 (太字): HLA型

※このアレルに対応するHLA型が判明していないためアレル名の第1区域で表記

県立広島病院 藤井 明美

・ SBT 法について

東海大学医学部 重成 敦子

2) 抗体検査結果解析

・ FlowPRA 法の検査状況の解析

福岡赤十字病院 金本 人美

・ Lab Screen による抗体検査

東海大学医学部付属病院 杉本 達哉

・ WAK Flow 法による抗体検査

北海道ブロック血液センター 高橋 大輔

・ その他検査法およびクロスマッチ

中央血液研究所 中島 文明

3) 部門別解析及び結果評価

・ DNA タイピング (表記法を含む)

福岡赤十字病院 橋口 裕樹

・ 抗体検査

近畿ブロック血液センター 高 陽淑

・ 追加発言 : 全血クロスマッチについて

福岡赤十字病院 橋口 裕樹

ワークショップで解析された総合結果を示す。DNA サンプルについては、日本赤十字社中央血液研究所で精査した結果を加え、総合的にリアサインした。各ローカスは、1 本鎖 DNA に分離してから塩基配列を確定し、可能な限り Ambiguity を回避した。参照ライブラリーは、IMGT/HLA 3.15.0 (2014 January 17) である。表記は本学会 HLA 標準化委員会のアレル表記法と結果報告の原則 (2010 年版 改訂 1.1 版) に従い記載した (表 2)。抗体サンプルは、日本骨髄バンク統計資料に基づく HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の抗原に対する反応と 0.1% 未満の抗原に対する反応に分けて示した。スコア「8」は 3 分の 2 以上の参加施設が陽性判定した抗原、スコア「1」は 3 分の 2 以上の参加施設が陰性判定した抗原、スコア「4」はどちらも 3 分の 2 に達しない抗原で表している (表 3)。これらの結果と各施設の提出結果を再確認し、精度管理及び技術向上に活用されたい。また、サンプル残余がある場合は、それらの用途に使用可能であることを付け加えておく。

4. QCWS サンプルの総合結果

配布した DNA 及び抗体サンプルについて、本ワーク

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング Luminex 法—

黒田ゆかり¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 九州ブロック血液センター

1. 概要

Luminex 法の参加施設は、今年 DNA-QC に参加した 69 施設中 43 施設 (62.3%) であり、年々増加している。使用キットは、OneLambda 社製 LABType が 10 施設、LABType HD が 12 施設、湧永製薬株式会社製 WAKFlow が 26 施設、医学生物学研究所製ジェノサーチが 5 施設であった。

タイピング実施ローカスは、全施設が HLA-A, B のタイピングを実施しており、その他 HLA-C (37 施設, 86.0%), HLA-DRB1 (41 施設, 95.3%), HLA-DRB3/4/5 (2 施設, 4.7%), HLA-DQA1 (8 施設, 18.6%), HLA-DQB1 (15 施設, 34.9%), HLA-DPA1 (5 施設, 11.6%), HLA-DPB1 (8 施設, 18.6%) の報告があった。

2. 解析方法

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

- 1) 結果の表記
- 2) 反応データ
 - ・陽性コントロールビーズ蛍光値の平均値とばらつき (%CV)
 - ・各プローブの Pmin/Nmax 値 (P/N 値) の比較
 - ・各施設のカットオフ値の変更状況
- 3) アサインミスとその原因

詳細なデータについては、学会ホームページに掲載の「第 18 回 QC ワークショップ報告集」を参照いただきたい。

3. 結果と考察

- 1) 表記については、年々増加するアリルにより複雑化してきたが、ambiguity として可能性のある全ア

リルを対象とし、表記法の原則に基づいた記入が必要である。

- 2) 反応データの確認には、各施設から提出された CSV ファイルを用いた。陽性コントロールビーズは、4 検体 (H2601 ~ H2604) において同等の蛍光値が期待され、ばらつきが少ないことが基本である。HLA-A Exon3 において %CV が 50.8% と大きくばらついている施設や陽性コントロールの平均蛍光値が他施設より明らかに低い施設が見られた。

Pmin/Nmax 値が小さい数値を示している場合、反応のメリハリが少ないことを示しており、いくつかの施設において適切なカットオフ値の設定が困難であったことが窺えた。

また、カットオフ値の変更については、変更が必要であった施設数が、変更が必要でない施設数を大きく上回った。カットオフ値は、カットオフ値を変更するプローブ数が多くなるほどアサインミスに繋がる可能性が高くなるため、安定した技術が求められる。昨年同様、提出された CSV ファイルを用いて全施設の再解析を実施したが、多数の偽陰性 (False Negative) や偽陽性 (False Positive) が見られ、判定が困難な施設が見られた。それらの施設の中には、はるかにデフォルトカットオフ値から外れているものを無理やり判定しているケースもあった。試薬の特性も考えられるが、明らかな施設間差が見られることから、技術的な改善のみならず解析時の判断基準の見直しも必要であると思われた。

- 3) アサインミスとして、記入ミスの 4 件とカットオフ値付近の反応でカットオフ値変更をせずに誤判定となった結果が 4 件あった。記入ミスは、入力内容の再確認を実施することで回避可能であるが、誤判定 4 検体の結果では、いずれも極めて稀な HLA

タイプに判定されており、判定結果を疑う必要があったと思われる。QCWS であるということから稀なタイプも含んでいるだろうという憶測により判定した施設もあったようで、思い込みによる HLA タイプの判定は、誤判定につながった。また、2 施設で HLA-C 座が誤判定となった H2603 の HLA-A, B, DR のタイプは A3/24, B44/60, DR13/15 であり、A3-B44-Cw5-DR13 というハプロタイプを知っているとミスを回避することが可能であったことから、HLA に関する知識を持ち総合的に判定することも重要であると考え。 (参考: A*03:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*13:01, A*33:03-B*44:03-C*14:03-DRB1*13:02)

また、全体的に反応が弱く複数のプローブで FN となっていた 1 施設では、一部のカットオフ値のみを変更し判定が行われており、各プローブの反応性を十分に確認されていないことが示唆された。

解析する際には、①全プローブの反応性をチェックすること、②陽性コントロールプローブの蛍光値が明確に陽性反応を示していること、③陰性と陽性の反応にメリハリがあること、④カットオフ付近のデータの判定には注意が必要であること、⑤ハプロタイプ考慮し判定すること、⑥良好でない反応データで判定は避けることなどを念頭に置き適切な判断をしなければならない。

4. まとめ

タイピング結果は、移植成績に大きな影響を与える重要な要素である。正しいタイピングには、「安定した技術」と「解析における的確な判断」が必要である。QCWS は、自施設のデータを確認することができる良い機会であることから、配布されたデータを活用し是非改善に繋げていただきたい。また、不明な点などは QCWS 事務局や解析担当者へご確認いただきたい。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート — 検査法別解析 DNA タイピング SSO 法 (INNO-LiPA) —

安尾美年子¹⁾

¹⁾ 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室

1. はじめに

INNO-LiPA による参加施設は昨年の QCWS より減り、今回の QCWS には補助として使用している 1 施設を含めて 4 施設の参加となった。その原因としては、昨年の QCWS でお知らせした方法別解析での学会の表記法で行うことが、特に INNO-LiPA では受け入れられないことが要因で参加しない施設があったと考えられる。その理由として、学会の表記法に従うと日常検査とはかけ離れ、非常に手間の掛かる判定・表記となるからである。

2. 解析結果

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

1) 結果判定

クラス I の HLA-A・B ローカスについては 2 桁アリの組み合わせがそれぞれ 1 つのみであったため、特に問題はなかったが、第 2 区域の ambiguity が判定された全アリル候補からではなく、日本人に多い 4 桁アリが含まれる組み合わせの中から選択されたものが多かった。また、全アリルを対象に ambiguity を選んでも第 2 区域の小さい順を全体からさがすのは困難であった。

HLA-C ローカスは 1 施設のみ提出であり、2 桁アリの組み合わせがそれぞれ複数あることから、学会の表記法に従うと抗原型も決められない第 1 区域が ambiguity となり、提出した施設は日本人アリの組み合わせを選択していた。

クラス II の HLA-DRB1 については H2601・H2604 は

日本人アリが含まれる組み合わせのみであるため、どの施設も正しく判定出来ていたが、H2602・H2603 ではいずれも抗原型がホモとなる組み合わせを見落としていた。この判定は、日本人アリを含まない組み合わせでの表記であるが、学会の表記法ではホモの組み合わせも加える必要があり、これにより抗原型での結果が ambiguity となる。

HLA-DQB1 については 1 施設のみで、特に問題はなかったが、やはり第 2 区域の ambiguity に全アリル候補からの表記の見落としがあった。

方法別解析の表記法を統一してからはじめての QCWS であり、学会の表記法がまだ十分に認識されていなかったこともあり、日本人アリを優先したための表記法の間違ひについては不正解とはしなかった。

2) 反応状態について

クラス I の陽性バンドにスコア 4 の多い施設があった。また同施設ではクラス II の HLA-DRB1 にスコア 2 の偽陽性バンドが多く見られた。陽性バンドの発色が弱いのは、おもに PCR の増幅不良が原因と考えられ、発色が弱いために発色時間を延長した結果、偽陽性バンドが増えたことが推察される。PCR の増幅効率が悪い原因として、サマルサイクラーの室温管理や機器の管理・整備などが行われていない可能性もある。

3. おわりに

昨年の QCWS において、今年度からの方法別解析では日本人に多いアリルを優先することなく、学会の表記法に従い判定結果を表記することとしたが、INNO-LiPA 使用施設には、十分に認識されていなかったようである。また、表記法を統一したことにより、その結果報告の煩雑さから、いくつかの施設が INNO-LiPA のデータ提出

を辞退したようである。

日本人に多いアレルを優先しなければ、INNO-LiPAに限らず多くのキットで抗原型も決められない判定結果になることが予測される。とくにINNO-LiPAの判定ソフトについては、可能性のあるアレルの組合せを判定していることから、全アレルから判定結果を表記することが理解し難いのではないかと思われた。

学会の表記法の目的は、日常のタイピングで使用している試薬の判定結果が、公認されたアレル全てに対して、

可能性のあるアレルの組合せを結果として表記することになっているが、日常検査の判定結果とはかけ離れている。また、学会表記をするために労力を費やすのは有意義とはいえない。とくに臓器移植の適合性検査としては抗原型を決定することが最も重要であることから、臨床に役立つQCWSの方向性としては、部門別の解析シート及び臓器移植での表記のルールと規定することも検討する必要がある。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング SSP 法—

藤井 明美¹⁾

¹⁾ 県立広島病院

1. 概要

1.1 参加状況

SSP 法の参加施設は 30 施設（全参加施設の約 43%）であり、昨年より 1 施設減少した。このうち、SSP 法のみでの参加施設は 22 施設（昨年同）、その他のタイピング法を併用していた施設は 8 施設であった。

1.2 参加部門

参加 30 施設中 23 施設は臓器移植部門または臓器移植部門と輸血関連、造血幹細胞移植部門であり、臓器移植部門での参加が多かった。また、臓器移植部門のみでの参加は 18 施設あり、そのうち 14 施設は SSP 法のみでの参加であった。

1.3 使用試薬

今回使用されていた試薬は、低解像度（low resolution）試薬では、OneLambda MicroSSP 28 施設、Invitrogen AllSetGold 2 施設であった。中解像度（medium resolution）試薬では、OneLambda MicroSSP 2 施設、Invitrogen AllSetGold および UniTray 2 施設であった。MicroSSP については、中でも日本人向けに開発販売された MicroSSP JPN の使用施設数が多く、SSP 法参加施設のうち 24 施設（SSP 法参加の 80%）で使用されていた。

2. 解析結果および考察

解析は使用した試料の Consensus Allele を基に、1. 結果の評価項目である①判定が正しいこと②結果が総合判定と祖語がないこと、2. 試験結果の評価項目である①相対的反応データに不備（false positive または false negative）がないことを確認した。結果表記の不備等により結果解析が困難であった報告は「解析困難」として示した。ただし、これら「解析困難」と示した結果は、評価

時の減点対象外とした。なお、結果の詳細は学会ホームページに掲載されているので、そちらを参照していただきたい。

2.1 判定ミス（miss assign）

判定ミスの主な要因として以下の 3 点が考えられた。

- ①反応の不備（false positive, false negative）
- ② ambiguity が正しく判定または記載されていない
- ③記載間違い（疑い）

①の反応の不備による判定ミスは同施設で複数検体報告されており、検査方法の見直しや再確認等原因の究明が必要と思われる。②の ambiguity が正しく判定、記載されず判定ミスとなった原因の多くは解析ソフトの未使用またはバージョン違いと思われる。解析ソフトは必ず使用し、またバージョンアップ等最新のデータを採用し判定する必要がある。③の記載間違い（疑い）は判定ミスに繋がる要因が認められないものである。

2.2 相対的反応データの不備

反応データに不備が認められた施設は 7 施設（偽陽性 5 施設、偽陰性 2 施設）であり、そのうち 5 施設で判定ミスを認めた。その他、「判定不能」のスコア 0 を報告した施設が 3 施設あった。

3. まとめ

本年度の SSP 法の結果は概ね良好であり、特に HLA-DRB1 座の判定ミスは無く、表記に問題があるのみであった。反応データの不備が判定ミスに繋がった 3 施設では同じ Jewel で偽陽性が認められており、試薬の使用方法の確認を行うとともに陽性、陰性の判定方法の再確認を行う必要がある。また、反応データのスコア化に不慣れな施設もあったので、SSP 法の反応データのスコアについては、別表を参照していただきたい。

SSP 法参加施設のほとんどで低解像度試薬（第 1 区域までの判定試薬）が使用されており，第 2 区域での判定が困難となっている。また，解析ソフトのバージョンでも判定結果が異なる場合もある。結果報告や解析を円滑に行うために，報告時の記載方法や内容など，今後も随時検討が必要と思われる。

表 SSP 法における反応データのスコア

スコア	反応データ
0	判定不能
1	陰性
2	偽陰性
4	偽陽性
6	弱陽性
8	強陽性

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング SBT 法—

重成 敦子¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部

1. はじめに (HP 掲載の解析報告集: 図 1)

今年度参加した施設が用いた SBT 法は、標的とする解析領域や使用機器から、SBT 法、SBT-NGS 法、及び SS-SBT 法の 3 つの検査法に分類された。

まず従来の方法である SBT 法は、各 Exon (例: Class I 領域の場合 Exon 2, 3, 4) の遺伝子を PCR 増幅し、Exon ごとに F 側, R 側の両側よりサンガー法により塩基配列を決定し、解析ソフトを用いてアレルの判定を行う方法である。この方法は、高解像度を有するが 2 つの染色体に由来する PCR 増幅混合産物をタイピングするため、SNP がどちらの染色体に由来する変異なのか区別できない、いわゆる phase ambiguity の問題をかかえている。

今年度から新しく提出された SBT-NGS 法は、Class I 遺伝子の場合 Exon 2, 3, 4 の各 Exon の配列を PCR 増幅し、Exon の配列を次世代シーケンサーにより決定し解析ソフトでアレル判定をする。この方法では、次世代シーケンサーで塩基配列を決定するため各 Exon の片側の染色体に由来する塩基配列が決定出来るため、Exon 内での phase ambiguity は解消されるが、各 Exon 2, 3, 4 塩基配列を決定しアレル判定をするため、Exon の組み合わせによる phase ambiguity が発生する問題が残る。

一方、SS-SBT 法では、HLA 遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域・5'UT 領域・Exon・Intron・3'側 UT 領域を含む遺伝子の全体を PCR 増幅し、次世代シーケンサーにより塩基配列を決定し解析ソフトでアレルの判定を行うため、Exon・Intron の領域を含む遺伝子全体を標的とすることで phase ambiguity の問題は解消される。

アレルの解析ソフトはそれぞれの方法により異なっており (図 2 参照)、SBT 法の解析ソフトとして、従来の Assign の他に SBTengin を使用した施設があった。これ

らの解析ソフトは、生データの管理・リファレンス更新など使用方法が異なっていた。また、SBT-NGS 法と SS-SBT 法では、次世代シーケンサーのデータが解析可能な専用の解析ソフトを使用して、アレルの判定を行っていた。

2. 参加施設・使用キットについて (図 3)

今年度の参加施設は 8 施設で、その内 1 施設からは 3 種類の結果 (SBT 法で 2 種類、SS-SBT 法 1 種類) が提出された。

SBT 法での参加は 6 施設で、全施設が AlleleSEQR HLA typing Kits (CELERA) を使用されていたが、1 施設で SeCore Sequencing Kits (invitrogen) が併用されていた。この試薬は HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 座のタイピングが可能で、全施設で使用されていた AlleleSEQR HLA typing Kits と比べ、SeCore DPB1 Locus Sequencing Kits は Exon 2, 3, 4 領域のシーケンスプライマーが含まれており、より長い領域の解析が可能である。アレル判定の解析ソフトとして、SBTengin が 4 施設、Assign が 3 施設で使用されていた。

SBT-NGS 法での参加は 1 施設で、Miseq class I+class II kits (Scisco genetics) と Miseq シーケンサーを使用し、専用の解析ソフトで解析していた。

SS-SBT 法での参加は 2 施設で、1 施設では GS Junior シーケンサーと GS Junior Titanium sequencing Kit (Roche)、他の 1 施設では Ion PGM シーケンサーと Ion PGM 400 Sequencing Kit (Life Technologies) が使用されていた。データ解析は、Omixon Target と SeaBass (Suzuki 法) を使用していた。

3. 結果及び考察

1) SBT 法での解析結果と考察

今回、QCWS を行った時点での最新のリファレンス (IMGT/HLA 3.15.0, 2014-01-17) を使用した結果で解析をした。本報告では、各施設間で判定したタイピング結果が異なるアレルに注目して解析を行った (図 4, 5, 6, 7)。

①アレルの絞り込み

HLA-DRB1 のタイピングキットには 3 種類のシークエンスプライマー (Exon 2 Forward, Exon 2 Reverse, Codon 86) が添付されている。この Codon 86 プライマーは、HLA-DRB1 のコドン 86 番目の GTG モチーフに相当するシークエンスプライマーである。

Assign 解析ソフトで解析する際に、コドン情報を設定することで Codon 86 (GTG) プライマーで得られる配列の有無や、その配列情報によりアレルを絞り込むことが可能な場合もある。今回の QCWS のサンプルでは、H2603 が Codon 86 の配列決定により、HLA-DRB1*13:01/105/117/+, DRB1*15:02:01 とさらに絞り込みが可能であった (図 8)。また、H2604 でも Codon 86 の配列決定により、HLA-DRB1*14:12, DRB1*15:02:01 とさらに絞り込みが可能であった (図 9)。

今回の AlleleSEQR HLA typing kits では、Exon 2 の 3' 側領域の 13 bp は解析対象外なので、HLA-DRB1*14:12:01 と HLA-DRB1*14:12:02 を区別することが出来ないが、今後の Kit の改良により解析可能となる予定である。

② SBT 法の ambiguity の結果表記

今年度の QCWS サンプルの SBT 法での結果では、片側のアレル群のみ第 1 区域に異なるアレルが複数存在する ambiguity が、4 ヶ所に認められた。

H2603 の HLA-C (Exon 2, 3, 4) タイピング, H2602 の HLA-DQB1 (Exon 2, 3) タイピング, H2601 の HLA-A (Exon 2, 3, 4) タイピング, H2604 の HLA-B (Exon 2, 3, 4) タイピングに、片側のアレル群のみ第 1 区域に異なるアレルが複数存在する ambiguity があった (図 10, 11, 12)。

これらの表記は、結果報告の原則に従い、第 2 区域で判定出来ないアレルが複数存在する場合はアレルを第 2 区域まで表記し「/ (スラッシュ)」でつないで報告しなければならない。

例えば H2602 の HLA-DQB1 (Exon 2, 3) タイピング結果では、DQB1*03:03, DQB1*04:01 または、DQB1*03:25,

DQB1*03:100 など、片側のアレル群のみに第 1 区域に異なるアレルが複数存在する ambiguity があった。この結果表記は、DQB1*03:03/25/30, DQB1*03:100/04:01/+ となる。この DQB1*03:100 は、IMGT データベースでの登録日が 2013 年 10 月 11 日と新しく登録されたアレルで、解析結果に反映されてない施設があった (図 11)。

また、H2601 の HLA-A (Exon 2, 3, 4) タイピング結果では、候補に含まれる新しく登録されたアレル A*31:79 と、A*66:15 の組み合わせが、見落とされた判定ミスがあった (図 12)。

2) 方法別による HLA-DPB1 のアレル判定の違いと結果表記 (図 13)

今年度の SBT 法による結果で、SBT 法, SBT-NGS 法, SS-SBT 法の HLA-DPB1 の方法別による結果が異なっていた。これは、HLA-DPB1 の解析領域が大きく関係していた。

SBT 法の AlleleSEQR HLA typing Kits は、Exon 2, 3 のみを標的としているので、多くの ambiguity が生じる結果であったが、SeCore DPB1 Locus Sequencing kits では Exon 2, 3, 4 の解析を行い H2601 と H2604 についてアレルの絞り込みが可能だった施設の報告があった。

SBT-NGS 法では、解析領域が Exon 2, 3 のみで判定を行うため、DPB1*05:01:01 と DPB1*135:01 の区別ができなかった。この場合の結果表記は、DPB1*05:01/135:01 となる。

さらに 2 施設が参加した SS-SBT 法では、Exon・Intron の全領域を標的とするので 1 施設ではこれらのアレルの絞り込みが可能であった。一方、他の 1 施設では DPB1*05:01:01 と DPB1*135:01 の区別できず ambiguity をしめず結果であった。この結果の相違は、次世代シーケンサーより十分な長さのデータとリード数が得られず、そのため Exon 4 領域の 1 塩基を正しく決定できなかったため、アレルの絞り込みが出来なかったことが原因と考えられる。

3) 判定ミス (図 14)

H2604 の HLA-C の結果で判定ミスがあった。SBT 法の Exon 2, 3, 4 の解析では多くの ambiguity が生じるが、SBT-NGS 法と SS-SBT 法の結果から片方のアレルに C*03:03:01 を有する場合、SBT 法の結果と併せると他方のアレルは C*12:02:02 か、C*12:112 のみの可能性しかない。しかし、SS-SBT 法の 1 施設では C*12:02:01 とのミス判定の報告

であった。これについても、次世代シーケンサーからの解析に必要な十分なデータが得られなかったことが原因と考えられる。

4) コードによる表記

今年度、初めてコードによる表記（“G”，“P”を付加する表記法）で結果を提出された施設があった。SBT-NGS 法の判定結果である。QCWS タイピング結果報告のアリル表記法と結果報告の原則では、コードを付加するグループアリルは、HLA アリルの WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System（以下「nomenclature」という。）を参照することになっている。結果報告の原則として HLA アリルに“G”を付加する表記は、ペプチドを収容するドメインをコードする領域内（クラス I は、Exon 2 と 3、クラス II は、Exon 2）の塩基配列が同一となる ambiguity を示すとされ、HLA アリルに“P”を付加する表記は、ペプチドを収容するドメインをコードする領域内（クラス I は、Exon 2 と 3、クラス II は、Exon 2）のアミノ配列が同一となる ambiguity を示すとされている（図 15, 16）。

H2603 の HLA-B の結果で、SBT-NGS 法では B*40:01:01G, B*44:02:01G と報告され、一方 SS-SBT 法では B*40:01:02, B*44:02:01:01 と報告され、両者で異なった結果判定のように見えるが、nomenclature の表記中には、SS-SBT 法の結果や、SBT 法の結果の一部が含まれているので、齟齬が生じているわけではない。

H2601, H2602, H2604 の HLA-DQA1 の結果で、SBT-NGS 法では DQA1*03:02P と、DQA1*05:03P との報告があったが、このコード表記は nomenclature には掲載されていない。この表記について、SBT-NGS 法実施施設からは、DQA1 解析を Exon 2, 3 領域を標的として行うため、nomenclature のコード表記よりアリルの絞り込みが可能だったため DQA1*03:02P と、DQA1*05:03P として報告した。コード表記による結果報告は、nomenclature の原

則に従ったアリル表記にすることが必要と思われる。

4. まとめ

今年度、SBT 法、SBT-NGS 法、SS-SBT 法の 3 つの検査法での結果が報告された。

SBT 法を解析する際に注意する点はいくつかあり、最新のリファレンスを使用し解析することが必要であり、本学会の表記法に従い DNA タイピング結果の表記を正しく記述する（図 17）。

今年度の SBT 法での不正解の理由は、表記ミスであった。SBT 法を行う際には、きれいなシーケンズデータを得ることを心がけ、リファレンスと ambiguity の表記に注意する必要がある。正確で精度の高い解析が出来たとしても、正しく表記することが重要であることは論を待たない。

しかしながら、毎年アリルの登録が急速に増加しているため、ambiguity の表記のみでは分かり辛くなりつつあり、場合によってはコメントの記載の必要性もあると思われる。また、必要に応じて補足試薬などを使用し、ambiguity を減らすことも考慮しなければならない。

また、次世代シーケンサーを使用した HLA タイピング法として、SBT-NGS 法が 1 施設、SS-SBT 法による参加が 2 施設あった。この SS-SBT 法は、新規アリルの同定、ambiguity の解消、null アリルの同定などが可能であり、第 4 区域までのアリル判定が実現できる、究極の HLA タイピングと考えられる。しかしながら、上記に報告したような問題点も見つかり、今後次世代シーケンサーの改良によりこれらの点を解決しつつ、さらに 1 分子の DNA について、より長く、精度の高い塩基配列を決定し、得られた情報を正しく判定することが必要と考えられる。

最後に、QC ワークショップに参加することで、施設の検査精度の管理・維持に役立つことから、HLA タイピング実施施設においては積極的な参加をお願いしたい。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査方法別解析 抗体検査 FlowPRA 法—

金本 人美¹⁾

¹⁾ 福岡赤十字病院 検査部 移植検査課 / 輸血細胞治療部

1. はじめに

第 18 回 HLA-QCWS での HLA 抗体検査で FlowPRA を実施した施設は、スクリーニング 25 施設、シングルアンチゲン 2 施設であった。前年 17 回と比較するとスクリーニングが 3 施設増加、シングルアンチゲンが 2 施設減少であった。参加内訳（重複含む）は、臓器 18 施設、輸血 10 施設、造血 6 施設と、臓器移植での参加が多い状況であった。

2. 試薬キットと測定機器

スクリーニング試薬はクラス I のロットは 25 施設中 23 施設で Lot.16 を使用し、残り 2 施設が期限切れの Lot.15 を使用していた。クラス II のロットは 24 施設中 22 施設で Lot.18 を使用。シングルアンチゲンは全て同一 Lot であった。

測定機器は、バクtonディッキンソン社 13 施設（FACS Calibur 8 施設、Canto II 5 施設）とベックマンコールター社 12 施設（NAVIOS 5 施設、FC500 4 施設、EPICS XL 3 施設）であった。

3. 解析方法

各施設からの報告データより判定スコアの一致率を求めた。スクリーニング試薬では、各サンプル、4 サンプルのトータル、陽性コントロールの %PRA についてそれぞれクラス I、II 別に集計した。シングルアンチゲン試薬では、各ビーズのスコアと LABScreen Single Antigen でのコンセンサス結果との比較を行った。詳細な集計データは、学会ホームページを参照されたい。

4. 解析結果

今回、配布された血清はクラス I 全て陽性、クラス II は SH2601 陰性、SH2602、SH2603、SH2604 は陽性を示した。スクリーニングでは、各施設からの判定スコアの一致率は、クラス I、II 共に 100% 一致であった。判定スコアは全て一致であったが、%PRA は施設によって乖離するデータも認めた。%PRA データの乖離の原因として、マーカー位置設定や、機器設定が要因としてあげられる。測定機器、コントロールが同一条件で比較しても、マーカーの位置はかなり違う施設も見受けられた。マーカーの設定方法は、学会ホームページの解析資料を参照されたい。尚、測定機器別にも集計、解析を行ったが、機器による SD、CV 等の有意な差は認めなかった。

シングルアンチゲンは、判定スコアの一致率を全体のコンセンサスアリアルと比較を行った。使用試薬の抗原ビーズの構成が違い為に、判定スコアが乖離する箇所も見受けられた。これは使用される試薬に添付されている Antigen Distribution 情報を十分に確認する必要があると思われる。また一部抗原ビーズにおいて反応性の違いも認めたことも、注意が必要である。

5. まとめ

FlowPRA の結果は一致率 100% であった。しかし、%PRA の数値は前年同様に施設により乖離した数値もあり、各施設において、測定機器調整、マーカーの設定手順を確認し、使用する試薬の特徴およびロット別の反応性について情報は把握することが重要である。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 LABScreen—

杉本 達哉¹⁾・土田 文子¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部付属病院 臨床検査技術科 輸血室

1. はじめに

抗体 QC 参加 52 施設で LABScreen を利用した参加は 32 施設 (61.5%) であり、抗体 QC 参加として最も多い方法であった。LABScreen 参加 32 施設のうち DNAQC 参加は 31 施設であり、クロスマッチ参加は 19 施設であった。部門別参加状況では輸血関連 19 施設、臓器移植 18 施設、造血幹細胞 16 施設、その他 (メーカー) 1 施設であった。参加施設毎でこれらの部門に複数関与して参加されている施設は 50.0% であった。LABScreen Single Antigen (以下, SA) 実施の際に、4 施設がスクリーニング検査の実施が不明であった。

2. 結果解析

1) 抗体の有無

H2601, H2602, H2603 および H2604 の抗体の有無について Class I 参加 32 施設の全施設で抗体ありと判定された。Class II では H2601 の抗体の有無について Class II 参加 31 施設のうち 30 施設で抗体なしと判定され、1 施設で抗体ありと判定された。Class II の H2602, H2603 および H2604 の抗体の有無では Class II 参加 31 施設の全施設で抗体ありと判定された。

2) 抗体種類の一致

各施設から提出された IgG 判定結果記入表の抗原別抗体反応値 (判定スコア) における施設毎の一致率は、Class I で 88.2 ~ 100.0% (平均 97.7%)、Class II で 87.9 ~ 100.0% (平均 97.9%) であった。

3) PC/NC およびカットオフ設定

各施設から提出された生データより再解析で得られた PC/NC 値は Class I が 11 ~ 1653、Class II は 19 ~ 1272 であった。各施設のカットオフ設定は 500 ~ 2000 であった。

4) Consensus

各施設から提出された IgG 判定結果記入表の抗原別抗体反応値 (判定スコア) において、3 分の 2 以上一致が得られた抗体特異性を Consensus とした。Class I では SH2602 で 1 抗原特異性、SH2603 で 5 抗原特異性および SH2604 で 2 抗原特異性に対する抗体の Consensus が得られなかった。Class II では SH2603 で 1 抗原特異性および SH2604 で 2 抗原特異性に対する抗体の Consensus が得られなかった。

5) その他

Class I の測定において、同一施設内で H2602 に H2601 が混入および H2603 に H2602 が混入したと考えられる事例があった。また、サンプル測定時におけるサンプルの前処理は、非特異反応吸着処理、EDTA 添加、フィルターろ過およびこれらを複数組合せ実施している施設があり、その処理方法は様々であった。

3. まとめ

LABScreen による抗体 QC 参加施設の抗体有無および抗原別の抗体特異性の一致率は、Class I 測定におけるコンタミネーション疑いおよび Class II における抗体有無の不一致を各 1 施設認めたものの、概ね良好な結果が得られたと考えられた。QC では同一サンプルを測定している。一概には言えないかもしれないが、PC/NC 値がある程度まとまった値となることが理想と考えられる。しかしながら、実際の PC/NC は施設毎でその値 (Baseline Normalized Value: 11 ~ 1272) に幅を認めている。施設間における測定機器間差等も推測されるが、サンプルの前処理が施設によって様々であることも PC/NC がバラツキとなる要因の一つと推測される。

Consensus が得られない抗体の特異性では、その測定

蛍光値が500～2,000前後のデータであった。今後、更に施設間の測定データで一致を得るためには、測定手技の統一を図るのみならず、カットオフ基準の統一が課題

と考えられる。カットオフ基準については、臨床的意義を踏まえた設定が重要と思われる。

第 18 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—

高橋 大輔¹⁾

¹⁾北海道ブロック血液センター

1. はじめに

WAKFlow HLA 抗体検出試薬（以下 WAKFlow MR）の参加施設は、クラス I が 13 施設と前年と同数であった。一方、クラス II は 7 施設と前年より 1 施設の減少であったが、第 12 回からほぼ横ばいであった。また、1 ビーズ 1 抗原が固相されている湧永製薬社製の WAKFlow HR 試薬の参加が 2 施設でみられた (Fig. 1)。試薬ロットは、WAKFlow MR クラス I では N0C が 10 施設、N0B が 3 施設で使用されており、血清の前処理は 11 施設で実施されていた。WAKFlow MR クラス II は、全施設で N0B を使用しており、6 施設において血清処理が実施されていた (Table 1)。解析結果の詳細及び当該レポートの図表については、学会ホームページ「第 18 回 QC ワークショップ報告集」の抗 HLA 抗体「WAKFlow による解析結果」を参照されたい。

2. WAKFlow MR クラス I

2-1) ビーズの反応性について

コントロールビーズの蛍光強度を Fig. 2 に示す。血清 SH2602 のバックグラウンドビーズ (BB) において、Fig. 2 の赤丸で示した施設 (施設番号 2) は他施設と比較して明らかに蛍光強度が高かったが、試薬ロットや血清処理等に施設間差は認められなかった。HLA ビーズの反応性を Fig. 3-6 に示す。施設番号 2 は、血清 SH2601, SH2602 で他施設と比較して蛍光強度が高い傾向にあったが、判定に重要である Index 値では施設間差を認めなかった (Fig. 3-4)、しかしながら、当該施設は BB でも蛍光強度が高い傾向にあることから、機器または操作等の再確認が必要と考える。血清 SH2603 において、施設番号 29 は蛍光強度ならびに Index 値が他施設と比べ低

値を示しており、抗原別判定の不一致の一因となりうると思われた (Fig. 5)。また、血清 SH2604 は、蛍光強度の施設間差を認めなかったが、一部のビーズ (Pc116) において他施設と比較して明らかな低値を示す施設 (施設番号 29, 53, 54) を認めた (Fig. 6)。このビーズは、Index においても明らかな差を認めたが、抗原別判定に影響を与える数値ではなかった。このような傾向がみられた 3 施設は、いずれもロット N0B を使用しており試薬のロット差による反応性の違いが疑われた。

2-2) 判定結果について

クラス I 抗体のスクリーニング結果は施設間差を認めなかった (Table 2)。各施設のビーズごとの反応性、およびカットオフ値から陽性と判定したビーズの一覧を Table 3-6 に示す。血清 SH2601, SH2602, SH2604 での各施設の陽性ビーズの種類と数は、若干の施設間差が認められたものの、概ね統一された結果であった (Table 3, 4, 6)。一方、血清 SH2603 は、ビーズの Index 値には施設間差を認めなかったにもかかわらず、施設間差を認めた。特に、カットオフ値を 1.5 前後と低めに設定した施設番号 2, 38 (Table 5 青枠)、他施設の 2 倍以上に設定した施設番号 52 (Table 5 赤枠) で顕著であった。また、施設番号 29 ではビーズの反応性が全体的に低下していたことによる著しい施設間差が認められた。

2-3) 抗原別判定不一致例等について

Table 7-8 に抗原別判定スコアについてまとめた表を示す。血清 SH2601, SH2602 において、若干の差異はあったものの、ほとんどの施設でほぼ一致した結果が得られた。ただし、血清 SH2601 について施設番号 53 でカットオフ値を変更したことにより B46 の判定にスコアリングの相違が認められた (Table 7)。また、施設番号 2 の血清 SH2601, SH2602, SH2604 において、Index 値に施設

間差が認められないにもかかわらず、他施設と比較してスコア 4 とした抗原数に乖離が認められたことから、当該施設は判定方法の再確認が必要と考えられた (Table 7, 8)。血清 SH2603 では、カットオフ値の違いにより施設間差が多く認められた。特に、Index 値が他施設と比較して低かった施設番号 29 において、ほとんどの抗原で陰性と判定されており、抗原ごとの反応性に乖離が認められた (Table 7)。以上のように、一部の血清で抗原別結果の不一致がみられたが、昨年と比較すると概ね統一された結果が得られた。

3. WAKFlow MR クラス II

コントロールビーズの蛍光強度を Fig. 7 に示す。バックグラウンドビーズ (BB) の蛍光強度について、Fig. 7 の赤丸で示した施設 (施設番号 54) は他施設と比較して明らかな高値であったが、試薬ロットや血清処理等に差はみられなかった。クラス I と同様に、クラス II についても蛍光強度や Index などの反応性についても判定に影響を与えるような施設間差は認められず (Fig. 8-10)、抗体の有無は全施設で一致していた (Table 9)。また、抗原別判定結果は Table 10 に示すように、一部の抗原で不一致を認めたが、いずれもカットオフ値付近のわずかな反応性の違いによるもので、どの施設も設定したカットオフ値と得られた Index 値から正しくスコアリングできていた。

4. WAKFlow HR

WAKFlow HR は、湧永製薬社製の試薬であり、現在 One Lambda 社から販売されている LABScreen Single An-

tigen (以下 LS-SA) と同様の特性をもつ試薬である。本試薬について、蛍光強度の比較を行ったところ、施設番号 53 で、若干ではあるが蛍光強度が高い傾向を認めた (Fig. 11)。Table 12 に LS-SA と WAKFlow HR の蛍光強度についてまとめた表を示す。血清 SH2602 の B35, SH2603 の Cw5, SH2604 の B46, B56 といった一部の抗原において判定スコアの不一致を認めた。また、LS-SA との反応性の比較において、LS-SA 陽性、WAKFlow-HR 陰性が 4 抗原、逆に LS-SA 陰性、WAKFlow-HR 陽性が 2 例といった乖離例が認められた。これらのうち、ICFA 法により生細胞との反応性を再確認したところ、2 例が弱陽性、残りの 4 例で陰性であり、LS-SA, WAKFlow HR のいずれの検査法においても non-HLA 様の反応を検出している可能性が示唆された。

5. まとめ

クラス I およびクラス II において、一部の施設で蛍光値の乖離を認めたが、Index 値にはほとんど影響せず、最終判定にも影響を与える数値ではなかった。また、C ローカスの特異性を含む血清 SH2603 で施設間の乖離が認められたが、各施設とも測定値、ならびに自施設で設定したカットオフ値から適切に判定出来ていたと考えられた。以上のことから、昨年と比較して特異性評価におけるスコアリングの施設の乖離が減少していた。また、ビーズの反応性と判定スコアの不整合、抗原表に記載のない抗原に対して判定を行っている、あるいは判定可能な抗原について判定不能ケースも認められず、昨年注意喚起した「抗原表から得られる情報の解釈」を正しく行っていると考えられた。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 その他検査法およびクロスマッチ—

中島 文明¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

1. その他検査法

その他検査法は、後述のダイレクトクロスマッチとの混同を避けるため、「FlowPRA, LABScreen, WAKFlow 以外の検査法において、SH2601～SH2604 の 4 サンプルを測定した場合」と定義して解析した。その結果、AHG-LCT 法（1 施設）、MPHA 法（4 施設）のみであった。また、LIFECODES のキットは、その取扱いメーカー 1 施設のみであったため、QCWS としての解析はここでは述べない。

AHG-LCT 法は、中央血液研究所でサンプル選定時に測定した C1qScreen と一致した反応とそうではない反応を認めた。AHG-LCT が補体結合性以外の抗体も検出する反面、C1qScreen より感度が低いという状況により、そのような差異が生じたと考えられる。

MPHA 法における結果の差異は、昨年解析では感作時間に依存していたが、本年は、そのような傾向は見られず、現状ではどこに原因があるか不明である。

以上、「その他検査法」の参加施設は年々減少し、十分な解析が困難になりつつある。

2. クロスマッチ

クロスマッチは、26 施設の参加があり、6 施設はダイレクトクロスマッチのみ、別の 6 施設は仮想クロスマッチのみで、残り 14 施設が双方に参加した。

ダイレクトクロスマッチは、「LCT, FCM, ICFA などクロスマッチ可能な検査方法において、SH2602 のみ測定し、クロスマッチ入力シートに記入されていること」と定義して解析した。LCT 法（6 施設）、AHG-LCT 法（2 施設）、FCM 法（8 施設）、ICFA 法（12 施設）の参加で

あった。FCM 法は FCS ファイルから再解析し、測定結果をスコア化した。ICFA 法は、追加ビーズの測定値も解析した。また、各測定データの表記や表示方法を一定の条件で統一した（学会ホームページ掲載資料参照）。LCT 及び FCM 法は、判定基準に統一性がなく、パラメータと判定基準及びコントロールとの関係性が一定していない。細胞測定数に問題のある施設もあった。ICFA 法は、測定条件や判定基準が統一されており、追加ビーズの反応も明確に認められた。

仮想クロスマッチは抗体サンプル (SH2602) に対して、2 本の DNA サンプル (H2601, H2602) を指定した。SH2602 × H2601 は、抗体検査で A26 陰性となる試薬を使用した施設はクロス陰性判定とし、その他は全て陽性判定であった。その中で、B61 を「予想される抗体反応」と判定した施設は、LABScreen の蛍光値 1,000 を若干超える程度を抗体陽性としていたからと思われる。SH2602 × H2602 は、全て陽性判定で一致していた。ここ数年の結果から、DNA タイピングの結果は、表記の違いはあるものの概ね一致しており、抗体検査法の感度や判定基準がクロスマッチ判定にそのまま影響していることが判ってきた。多くの場合、HLA に対する抗体反応は複数の特異性を示すため、どのローカスと反応するかハプロタイプを考慮しながら判断する必要がある。抗原側からの視点も要求される。このように、仮想クロスマッチは、HLA の抗原抗体反応を考える絶好の機会であり、そのトレーニングにもなりうる。

現在、本学会のクロスマッチ 2 項目と移植学会のクロスマッチが実施されており、次年度以降、サンプルの取り扱いや解析において本学会主体に整理されていく予定である。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —部門別解析 DNA-QC, 結果の表記法—

橋口 裕樹¹⁾

¹⁾ 福岡赤十字病院 検査部 移植検査課 / 輸血細胞治療部

1. はじめに

18th の DNA-QC 参加は、68 施設であり、昨年より 2 施設増加した。部門別の内訳は、臓器移植部門（43 施設、63.2%）、輸血部門（29 施設、42.6%）、造血幹細胞移植部門（26 施設、38.2%）、その他（7 施設、10.3%）であった。内訳に大きな変化はないが、15th から参加施設数は徐々に増加傾向にある。また参加施設の 68 施設中、26 施設が重複部門での参加であり、さらにその内の 11 施設では 3 部門での重複であった。参加施設の業務内容が多岐に渡る事が示唆された。

2. QC テーマと配布サンプル

DNA-QC のテーマは 1) 正確な DNA タイピングが行えること、2) DNA タイピング結果の表記を正しく記述できること、3) 学会の表記法に従い正確に表記すること、4) DNA タイピング結果に対応した HLA 抗原型を正確に読替えること、5) Ambiguity となるアレルと日本人集団でのアレルの解説である。配布サンプルは、購入した細胞から抽出した DNA を 4 サンプル配布（10 µg, 20 µg）、日本人由来の細胞で高頻度に検出される HLA 型であること、日本人由来で稀な HLA アレルであることを条件とした。

3. 使用タイピング

SSP 法、SSO 法（Luminex, INNO-LiPA）、SBT 法での参加であった。各部門で最も多く使用された方法は Luminex SSO 法であり、これ以外に、部門別でみると臓器移植部門で SSP 法の使用が多かった。また約半数近くの施設では 2～4 法の検査方法を用いての参加であった。

4. 結果評価

結果評価は、HLA-QC ワークショップ結果評価の基準に基づき行った。評価対象は HLA-A, -B, -C, -DRB1 の 4 座で、項目は 1) 判定結果、2) 結果表記、3) 試験・検査状況の 3 項目であった。

4-1. 判定結果の評価（基本評価点 60 点）

判定結果の評価点分布をみても、大幅な減点施設はなく、平均 58.8 点であり、16th（56.5 点）、17th（57.8 点）と比較し、少しずつ得点はあがってきている。

4-2. 結果表記の評価（基本評価点 40 点）

大幅な減点施設はなく、全施設が 31–40 点に分布していた。平均 39.6 点と 17th（38.7 点）より点数はあがっているが、数施設において HLA アレルから HLA 型への読み替えて誤表記を認めた。この点は学会ホームページの表記の原則を熟読して頂きたい。（<http://jshi.umin.ac.jp/standarization/index.html> 参考）

4-3. 試験・検査状況の評価（3 段階評価）

評価は A（良好：反応データが全て妥当である）、B（要確認：反応データの一部不備がある）、C（要改善：反応データのほとんどが不備である）の 3 段階評価を行った。今回も C 評価はなかったが、B 評価は 1～2 割程認める。それらの施設では False Positive、False Negative を認め、これが誤判定に繋がる可能性もある。コメント等で指摘を受けた施設は、生データを確認頂きたい。

5. 総合評価（判定結果 60 点+結果表記 40 点）

総合評価点は、判定結果の評価点 60 点+結果表記の評価点 40 点=100 点であり、A 評価（100 点：良好）、B 評価（60～100 点未満：要確認）、C 評価（0～60 点未満：要改善）とした。今回は平均 98.4 点で、分布も

B 評価 (60 ～ 100 点未満) の施設が 26 施設 (38%) と徐々に減少傾向、A 評価 (42 施設, 62%) が昨年より 10% 増加した。

6. 結語

18thQCWS DNA 部門の結果を総合的に判断すると、

過去の結果と比較しても全体水準は維持され、参加部門や検査方法別に比較しても大きな差異は認めなかった。今後、更なる精度向上に向けて参加し、結果を出すだけでなく、指摘事項を再確認し、問題点の把握、改善に取り組む事こそが、本来の QC の目的であり、自施設の精度向上に繋がると考える。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —部門別解析および結果評価（抗体部門）—

高 陽淑¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

1. 部門別解析

1.1. 概要

抗体検査への参加は、輸血部門 28 施設、臓器移植部門 29 施設、造血細胞移植部門 20 施設（全て重複あり）で昨年（17thQCWS）より 2 施設多い 51 施設（このうち初参加は 1 施設）となり若干の増加傾向を認めた。例年、複数部門に参加する施設が認められるがその構成を調査したところ、全部門に参加は 8 施設、逆に単独部門参加は 28 施設（輸血 12、臓器 16）で、造血細胞移植部門への単独参加は無かった。また、複数部門に参加する施設では抗体特異性同定検査の実施率が 88% 以上と高いのに比べて、単独部門参加の施設では実施率が 60～70% と低い傾向を認めた。

施設別の参加状況については、全体の 2/3（67%）を大学・病院が占めており、残りの 1/3 は血液センターと検査センター等がほぼ同数を占めていた。このような傾向が認められる背景には、昨年同様に臓器移植学会との共同企画（クロスマッチ）をきっかけとして臓器移植関連施設の参加が増加したことがある。

また、抗体検査実施状況については、この数年間と同じく 51 施設中 49 施設（96.1%）が 1 種類以上の蛍光ビーズ法を応用した方法を実施しており、輸血・造血細胞が LABScreen または WAKFlow を、臓器が Flow PRA または LABScreen（いずれも重複あり）をよく使用していた。

1.2. 抗体検出結果

全部門での総合判定から抗体検出（抗体有無）結果の一致率を見た。昨年度（17thQCWS）は抗 HLA クラス II 抗体での 1 サンプルを除くすべてが一致率 100% と非常に良好な成績であったが、今回は、抗 HLA クラス I 抗体（SH2603 の一致率 97.9%）、抗 HLA クラス II 抗体

（SH2601 の一致率 97.6%）ともに全サンプルで 100% の一致には至らなかった。

この要因は、抗 HLA クラス I、II 抗体ともに使用した検査方法の特性によるものと考えられた（検査方法別解析結果参照）。例年のコメントとなるが、抗体検出における試薬の選択は慎重にしなければならない。

1.3. 抗体特異性同定検査実施状況

抗体特異性同定の部門別実施率（実施数/部門別参加数×100）を比較すると、抗 HLA クラス I 抗体では全参加施設で 72.5% であるのに対して臓器が 71.4%、抗 HLA クラス II 抗体では全参加施設で 58.8% であるのに対して輸血が 53.5% と低い実施率であった。これとは対照的に造血細胞は、抗 HLA クラス I 抗体が 85%、抗 HLA クラス II 抗体が 75% と全体的に高く、造血細胞移植部門における抗体検査の重要性が伺われた。

2. 結果評価

2.1. 抗体 QC 結果比較について

各施設から提出された総合判定結果について、部門別評価と同様の計算方法（後述）で求めた「Consensus Result」を暫定的な正解として各施設の抗原別反応値を比較し、同じスコアの場合は「一致」、異なる場合は偽陽性（1⇒8）「FP」あるいは偽陰性（8⇒1）「FN」と定義した。その比較結果について、サンプル毎および検査方法別に一致状況（評価点ではない）を調査した。

1) サンプル別：抗 HLA クラス I 抗体では SH2602 に FP を多く、SH2604 に FN を多く認めた。これらの抗原に対する反応性はいずれも LABScreen single antigen で各施設が設定した cut off 前後に位置していたことが影響しているようであった。また、C ローカス抗体を含む SH2603 については FP および

FN が同等に存在し選択した検査方法に依存していると考えられた。抗 HLA クラス II 抗体については、SH2602 について FN および判定保留が最も多かった。このサンプルに限らず、抗 HLA-DQ 抗体については単なる基準の相違ではなく判定に対する考え方について議論の余地がある。

- 2) 方法別：LABScreen では一部の施設で FP あるいは FN のどちらかに偏る傾向を認めた。これは測定手技や判定基準の違いを反映している。その一方、それ以外の検査法では用いる抗原パネルが（single antigen と比較して）不足気味であるため FN となる場合が多く、保留率ともリンクしている傾向を認めた。
- 3) 施設別：血液センターおよび検査センター等の施設はほとんど継続参加しており毎年若干の変動はあるが、全体に安定した結果であった。それに対して、大学・病院については、参加施設数も多く結果の良・不良は用いた方法や判定基準に影響されている。今回の結果で他施設との乖離が散見された施設においては、抗体特異性の同定検査が日常的に必要なのであれば、用いた検査方法（検査手技、判定方法も含む）について再考するべきである。

2.2. 抗体 QC 部門別評価について

日本人 HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の HLA 抗原（結果シートに太字で記載）について、参加施設から提出された結果が共通となる割合を「基準値（現在は 0.67）」とし、それ以上の構成比率を示す抗原のみを対象として評価点を算出した（それ以下の構成比率を示す抗原は対象外）。評価点の計算方法については HP 掲載の解析結果を参照されたい。

2.3. 評価内容

- 1) 抗体検出については、A 評価（80 点以上）が 47

施設（92.2%）、B 評価（40～80 点未満）1 施設（2.0%）、C 評価（40 点未満）3 施設（5.9%）であった。ただし C 評価の 3 施設は判定シートへの記載漏れと考えられ、抗体検出の結果そのものについては全体的に良好な結果であった。

- 2) 抗体特異性同定検査を実施した 37 施設中、評価 A が 32 施設（86.5%）、評価 B が 2 施設（5.4%）、評価 C が 3 施設（8.1%）となり、昨年よりも評価 A および B の施設が増加し、評価 C の施設が減少するという結果であった。昨年見られたような明らかな理解不足による記入漏れや誤記と推測される箇所も認めず、参加施設は本来の実力を発揮した結果であると判断された。

3. 結語

18QCWS の結果を総合的に判断すると、これまで以上に判定結果において高い一致率を認めた。この判定が『QCWS での評価点を意識した特別な基準』ではなく、日常的に実施している基準であるならば、QCWS に参加する施設の抗体検査における判定基準はかなり一致してきたと言える。

その一方で、抗原別判定結果の一致度は概ね検査方法に依存するため、検査方法の選択はもとより検査手技や結果の解釈など経験に基づく差異にも影響される（方法別解析データを参照）。抗体 QC の結果解析では施設間差だけがクローズアップされてしまうことは否めないが、「差があること」を問題視しているのではなく、その原因を解明することを目的としている。その事を理解したうえで参加施設は今回の解析結果を考察し、自施設の精度管理に利用するとともに日常検査の目的に合致した方法および判定基準を設定することが重要である。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート【追加発言】 —血液を用いた「クロスマッチ」の実施報告— 日本組織適合性学会 QCWS との連携

橋口 裕樹¹⁾

¹⁾ 福岡赤十字病院 検査部 移植検査課 / 輸血細胞治療部

1. 概要

日本移植学会では、統一した全血サンプル由来のリンパ球を用いた交差試験（以下、「クロスマッチ」という。）の精度管理が必要だと思慮し、平成 25 年 4 月に日本組織適合性学会との連携により、試行的に実施する事なり、今回 2 回目の実施となった。

2. 経過

日本組織適合性学会が開催する 18thQCWS 参加施設の内、34 施設からのクロスマッチ参加申し込みがあった。検査施設の内訳は、臓器移植ネットワーク検査施設が 23 施設、移植関連病院が 6 施設、検査センター 4 施設、試薬メーカー 1 施設であった。

日本移植学会移植関連検査委員会で採血した全血の発送は、日本組織適合性学会が平成 26 年 4 月に QCWS 試料を配布するのに合わせ血清配布の翌週に全血を参加施設に配布した。到着後、直ちに T 細胞を分離しクロスマッチを実施した。ACD-A 液入全血の発送には、宅配便（常温）で発送、全国の参加施設には翌日、翌々日には到着し、細胞分離に関して大きな影響は無かった。集計結果は各施設にメールにて報告し、9 月に開催された第 50 回日本移植学会、日本組織適合性学会 18thQCWS で報告を行った。

3. 検査方法および試料選択について

検査方法は各施設で日常的に行っている方法を選択可とした。検査方法を見ると CDC 法（22 施設）、AHG-CDC 法（7 施設）、FCXM（24 施設）、ICFA 法（11 施設）を使用し、半数以上の施設で複数の検査方法を使用して

試料 1			
A*24:02	B*40:01	C*03:04	DRB1*09:01
A*31:01	B*40:02	-	DRB1*12:01
試料 2			
A*02:01	B*51:01	C*07:02	DRB1*14:03
A*02:06	B*52:01	C*12:02	DRB1*15:02

の結果報告であった。配布した全血の HLA は表の通りである。

日本組織適合性学会の抗体部門 QCWS（抗体 QC）で使用する抗血清 4 本の 2 本を抗体の特異性より #2602、#2604 を選択した。

4. 検査結果

今回、準備したサンプルは、クロスマッチ弱陽性の結果になるものも含まれており、検査方法の検出感度の差により、方法別にみると陰性、陽性と乖離した結果もあった。この為、全体の一致率は昨年度より低くなったが、検査方法の感度差が原因であると推測される。また、一部の HLA 抗体には、抗体検査で使用する精製抗原とは反応するが、生リンパ球と反応しないものが含まれていた事も推測された。

5. まとめ

昨年度に続き、全国規模の統一した全血サンプル由来のリンパ球を用いたクロスマッチを、日本組織適合性学会の協力のもと実施した。次年度は、参加申し込み方法を変更し、精度管理を予定、準備を進めている。

今回、各施設にアンケートを行い、CDC、FCXM の反応条件、判定基準を調査した。施設により条件が大き

く異なり、これも施設間差の原因となると考えられ、臓器移植検査に関わる検査方法の統一、マニュアル整備等

も行い事が急務であると考えられる。