

第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過及び QCWS 試料の総合結果—

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

日本組織適合性学会 組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会[#]

1. ワークショップの経過

平成 28 年 1 月に第 20 回 HLA-QCWS の開催及び参加案内を、学会誌及び学会ホームページ（以下、学会 HP）に掲載し、平成 28 年 2 月までに 76 施設からの参加申し込みがあった（表 1）。参加内容の詳細は DNA-QC : 71 施設、抗体 QC : 58 施設、クロスマッチ（日本移植学会連携クロスマッチ含む）: 53 施設である。また、QCWS 参加希望施設からの連絡及びデータ収集等については、電子メール主体に実施した。

DNA-QC 及び抗体 QC に用いる試料の選択は、第 24 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 11 日に試料を発送し、4 月 19 日に QCWS 結果入力用のシートファイルを参加施設にメール配信した。結果提出の締切りを 5 月 28 日に設定し、6 月 2 日までに全施設から結果が提出された。6～7 月中に提出データの確認と生データの集約作業を終了し、7 月 19 日に各解析担当者に解析用データを配布した。

8 月中に各検査法別の解析を一旦締め切り、解析結果の公表内容を統一化する目的で総合解析担当と各検査法解析担当者間で解析結果の取り纏めについてメールでのディスカッションを行った。平成 28 年 9 月中旬までに、最終報告データを作成し、解析結果をホームページで公開し、参加者が必要に応じてダウンロード出来るようにした。同時にデータ集を CD-R で配布した。また、解析結果は QCWS 集会での報告及び本学会誌（MHC）への掲載を行った。

2. QCWS のテーマ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 タイピング結果の表記を正しく記述できること、③学会の表記法に従って正確に表記すること、④ DNA タイピング結果に対応した HLA 抗原型に正確に読替えること、⑤日本人集団における ambiguity となるアレルの解説の 5 点とした。試料は、前年度の QCWS 部会で協議した「日本人由来の細胞で高頻度に検出される HLA 型であること」、「日本人由来で稀な HLA アレルであること」の要件に合う細胞を 4 種類購入し、抽出した DNA の配布を行った。これとは別に、データ収集の目的で、各施設で陰性コントロールのデータ取得について任意参加を呼びかけた。

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

田中秀則¹⁾、中島文明²⁾、成瀬妙子³⁾、高陽淑⁴⁾、橋口裕樹⁵⁾、一戸辰夫⁶⁾、石塚敏⁷⁾、太田正穂⁸⁾、川井信太郎⁹⁾、吉川枝里¹⁰⁾、木村彰方³⁾、黒田ゆかり¹¹⁾、小林孝彰¹²⁾、藤原孝記¹³⁾、宮崎孔¹⁴⁾、湯沢賢治¹⁵⁾

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

表 1 第 20 回 HLA-QCWS 参加施設

		(受付日付順)	
1	沖縄県立中部病院	検査科 HLA検査	
2	北里大学病院	輸血部	
3	日本赤十字社 九州ブロック血液センター	検査二課	
4	香川大学医学部附属病院	輸血部	
5	岡山大学病院	輸血部	
6	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	
7	日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所	研究開発部	
8	JCHO 中京病院	検査部	
9	東京女子医科大学	中央検査部移植関連検査室	
10	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部	
11	公益財団法人 鹿嶋郷賢研究所	HLA検査室	
12	熊本大学医学部附属病院	中央検査部	
13	東海大学医学部附属病院	臨床検査技術科 輸血室	
14	帝京大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター	
15	INPO 腎泌尿器疾患研究所		
16	日本赤十字社 近畿ブロック血液センター	検査部 検査三課	
17	公益財団法人 HLA 研究所		
18	がん・感染症センター 都立駒込病院	輸血・細胞治療科	
19	日本赤十字社 中四国ブロック血液センター	検査一課	
20	佐賀大学医学部附属病院	輸血部	
21	医薬基盤・健康・栄養研究所	難病資源研究室	
22	松江赤十字病院	検査部 輸血管理室	
23	ジェノタイプファーマ株式会社	ゲノム解析部門HLA検査課	
24	福協医科大学病院	臨床検査センター 遺伝子・HLA検査室	
25	株式会社 LSIメディエンス	遺伝子解析部 遺伝子検査G	
26	日本赤十字社東海北陸ブロック血液センター	品質部 検査三課	
27	香川県立中央病院	中央検査部	
28	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	
29	札幌医科大学附属病院	検査部	
30	九州大学病院	遺伝子・細胞療法部	
31	福岡赤十字病院	検査部 移植検査課	
32	愛媛県立衛生環境研究所	疫学情報科	
33	北海道ブロック血液センター	品質部検査一課二係	
34	岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部 免疫血清検査室	
35	熊本赤十字病院	検体検査課	
36	大分県立病院	輸血部	
37	京都府立医科大学附属病院	輸血・細胞医療部	
38	山形県立中央病院	輸血部	
39	鹿児島大学医学部・歯学部附属病院	輸血・細胞治療部	
40	宮崎大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部	
41	株式会社 リプロセル	技術部	
42	社会医療法人北楯会 札幌北楯病院	臨床検査科	
43	株式会社 医学微生物学研究所	品質管理部	
44	虎の門病院	輸血部	
45	徳島大学病院	輸血・細胞治療部	
46	筑波大学	消化器外科研究室	
47	独立行政法人国立病院機構千葉東病院	臨床検査科	
48	公立大学法人 横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部	
49	国立病院機構 岡山医療センター	臨床検査科 輸血管理室	
50	静岡県立総合病院	検査部輸血細胞治療科	
51	JCHO 仙台病院	統括診療部臨床検査科診療部	
52	湧永製薬株式会社	試験・診断薬事業部	
53	広島大学病院	診療支援部 遺伝子細胞療法部門	
54	秋田大学医学部附属病院	腎疾患先端医療センター	
55	関西医科大学附属枚方病院	輸血・細胞治療科	
56	株式会社エスアールエル	総合品質保証グループ	
57	NHO 米子医療センター	臨床検査科	
58	株式会社 保健科学研究所	QAU	
59	長崎大学病院	細胞療法部	
60	三重大学医学部附属病院	輸血部	
61	日本赤十字社東北ブロック血液センター	検査一課	
62	北海道大学病院	検査・輸血部 輸血検査室	
63	株式会社 ビー・エム・エル	第三検査部 ゲノム検査課	
64	旭川医科大学病院	臨床検査・輸血部	
65	関東甲信越ブロック血液センター	検査部 検査三課	
66	名古屋第二赤十字病院	医療技術部	
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	
68	国立循環器病研究センター	臨床検査部	
69	株式会社 ベリタス	技術グループ	
70	県立広島病院	臨床研究検査科	
71	金沢医科大学病院	北陸腎移植HLA検査センター	
72	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部	
73	岐阜大学医学部附属病院	検査部	
74	富山大学附属病院	検査・輸血細胞治療部	
75	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部	
76	愛知医科大学	腎疾患・移植免疫学寄附講座	

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検体を選択し、配布することとした。また、配布する検体は、「日本人に通常検出される抗 HLA 抗体であること」とした。

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

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

また、日本移植学会連携クロスマッチでは、抗体 QC で使用する試料を一部共用して実施した。

3. 解析方法

冒頭に参考マニュアルの趣旨説明をした後、DNA タイピング結果解析 (DNA-QC) と抗体検査結果解析 (抗体 QC) に分け、それぞれ試料説明、総合解析、検査方法別解析の順に報告した。総合解析では部門別解析と評

価結果に加え、DNA-QC では表記法、抗体 QC では不一致原因など問題点を提起しディスカッションした後、検査方法別解析で説明する形とした。

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。近年、ルミネックス法の参加数が増加しデータ量が膨大になるため、DNA-QC では① LABType と② WAKFlow・Genosearch、抗体 QC では① LABScreen と② WAKFlow に担当を分割して解析した。

- 1) DNA タイピング結果解析
 - ・試料説明 HLA 研究所 田中 秀則
 - ・総合解析 (部門別含む) 九州ブロック血液センター 黒田ゆかり
 - ・SSP 法 大阪府立急性期・総合医療センター 高山 智美
 - ・SSO (ルミネックス) 法① 東京女子医大 石塚 敏
 - ・SSO (ルミネックス) 法② ジェノタイプファーマ 奥平 裕子
 - ・SBT (Sanger, NGS) 法 HLA 研究所 小島 裕人

2) 抗体検査結果解析

- 試料説明
中央血液研究所 中島 文明
- 総合解析 (部門別含む)
近畿ブロック血液センター 高 陽淑
- FCM (FlowPRA) 法
福岡赤十字病院 金本 人美
- ルミネックス法①
帝京大学医学部附属病院 蟹井はるか
前島理恵子
藤原 孝紀
- ルミネックス法②
関東甲信越ブロック血液センター 小林 洋紀
- その他抗体検査法, クロスマッチ
中央血液研究所 中島 文明
- 移植学会連携全血クロス
福岡赤十字病院 橋口 裕樹

DNA 試料は、主に参加各施設の結果から総合的にリ
アサインし、Ambiguity を可能な限り回避するため、
HLA-A, B, C, DRB1, DPB1 (一部) アリルについて日本
赤十字社中央血液研究所で1本鎖DNAに分離後、
IMGT/HLA 3.24.0 (2016-04) を参照ライブラリーとして
塩基配列を再確認した。表記は本学会 HLA 標準化委員
会のアリ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)。

抗体試料は、参加各施設の総合判定結果を集計し、
HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の抗原に対する反応と 0.1%
未満の抗原に対する反応に分けて記載した。スコア「8」
は3分の2以上の参加施設が陽性判定した抗原、スコア
「1」は3分の2以上の参加施設が陰性判定した抗原、ス
コア「4」はどちらも3分の2に達しない抗原として表
示した。HLA 遺伝子頻度は日本赤十字社で公開されて
いる造血幹細胞移植情報サービスの統計資料を参照した
(<http://www.bmdc.jrc.or.jp/generalpublic/statistics.html#an1>)
(表3)。

各施設の提出結果の再確認、精度管理及び技術向上に、
これらの結果と残余試料を活用していただきたい。

4. QCWS 試料の総合結果

配布した DNA 及び抗体試料について、本ワークショッ
プで解析された総合結果を示す。

表2 第20回 HLA-QC ワークショップレポート : DNA 試料の総合結果

HLA-Class I	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
H2801	A*02:03:01 A2	A*24:02:01:01 A24	B*38:02:01 B38	B*54:01:01 B54	C*01:02:01 Cw1	C*07:02:01 Cw7
H2802	A*01:01:01:01 A1	A*02:07:01 A2	B*37:01:01 B37	B*48:01:01 B48	C*06:02:01 Cw6	C*08:01:01 Cw8
H2803	A*03:01:01:01 A3	A*11:01:01:01 A11	B*44:02:01 B44	B*51:01:01 B51	C*03:04:01 Cw10	C*05:01:01 Cw5
H2804	A*24:02:01:01 A24	A*33:03:01 A33	B*15:18:01 B71	B*40:03 B61	C*03:04:01 Cw10	C*07:04:01 Cw7

HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
H2801	DRB1*04:03:01 DRB4*01:03 DR4 DR53	DRB1*08:03:02 - DR8 -	DQA1*01:03 DQB1*03:02 DQ8	DQA1*03:01 DQB1*06:01 DQ6	DPA1*02:01 DPB1*13:01 DPw13 ※	DPA1*02:02 DPB1*19:01 DPw19 ※
H2802	DRB1*09:01:02 DRB4*01:03 DR9 DR53	DRB1*10:01:01 - DR10 -	DQA1*01:05 DQB1*03:03 DQ9	DQA1*03:02 DQB1*05:01 DQ5	DPA1*01:03 DPB1*04:02:01 DPw4	DPA1*02:02 DPB1*05:01:01 DPw5
H2803	DRB1*04:05:01 DRB4*01:03 DR4 DR53	DRB1*15:01:01 DRB5*01:01 DR15 DR51	DQA1*01:02 DQB1*04:01 DQ4	DQA1*03:03 DQB1*06:02 DQ6	DPA1*02:02 DPB1*05:01:01 DPw5	- - -
H2804	DRB1*04:01:01 DRB4*01:02 DR4 DR53 ※	DRB1*14:05:01 DRB3*02:02 DR14 DR52	DQA1*01:04 DQB1*03:01 DQ7	DQA1*03:03 DQB1*05:03 DQ5	DPA1*01:03 DPB1*02:01:02 DPw2	DPA1*02:02 DPB1*05:01:01 DPw5

上段 (斜体): HLA 遺伝子型
下段 (太字): HLA 型

※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の第1区域などで表記

第20回 HLA-QC ワークショップレポート —試料説明 DNA-QC—

田中 秀則¹⁾

¹⁾ 公益財団法人 HLA 研究所

1. はじめに

DNA-QC の試料として使用される細胞は、市販品ないしバンクなどに寄託され連結不可能匿名化された細胞を日本組織適合性学会が入手したものをを用いている。また、使用する細胞の選択は、バンクから提供された HLA タイピングを基に QCWS 集会でのアンケート調査結果を参考として選択を行っている。14～19thQCWS 集会でのアンケート調査結果を、表1に示す。(図・表については学会ホームページ参照) 希望が多い「①日本人で一般的なタイプ」として、日本人由来の細胞バンクからの使用細胞の選択を行った。また、日本人で稀な HLA タイプの試料として、2010年までは HLA-A, B, DRB1 座でのアレル頻度が 0.05% 以下の細胞を選択して来たが、2011年以降は 0.5% 以下のアレル頻度の細胞を選択してきている。

2. HLA アレルについて

表2に細胞入手時の HLA タイプを、表3に今回の QCWS の結果として得られた HLA アレルを示した。HLA-B 座の全 DNA 試料、HLA-A, C, DRB1 座の一部で、日本人において 0.5% 以下の稀なアレルの DNA 試料であった。また、他の HLA 座での頻度は稀なアレルはなく、HLA-DPB1 座のアレルが DPB1*13:01/107:01 と NGS を用いたタイピングでも Ambiguity として判定された。また、HLA-DPA1 座で 02:02:01V と判定されており、新たなアレルとして判定された。

3. HLA ハプロタイプについて

使用細胞の HLA ハプロタイプについて、HLA-A, B, C, DRB1 座の HLA タイプから「ハプロタイプ推定ツール」(URL: http://hla.or.jp/med/haplo_tools/) を使用して推定を行ったので、その結果を図1-1及び2に示す。

3種類の細胞 (H2801, H2802, H2803) において、4種類の稀なハプロタイプ (日本人でのハプロタイプ頻度が 0.001% 以下と推定される) が推定された。また、これら4種類の稀なハプロタイプと類似するハプロタイプの検索を行った (図1-1及び1-2に示す)。類似のハプロタイプから、稀な4種類のハプロタイプは、2種類で HLA-A 座と B 座間 (H2802, H2803)、他の2種類で HLA-B 座と DRB1 座間 (H2801, H2803) のリコンビネーションにより形成されたハプロタイプである可能性が推定された。

また、稀な HLA ハプロタイプの組み合わせの HLA タイプでの HLA 適合者数について、造血幹細胞適合検索サービスで検証を行った。稀な HLA ハプロタイプを組み合わせとなった H2803 の HLA タイプの場合、HLA-A, B, C, DR での適合者は 0 人であった。一方、H2804 稀でない組み合わせの HLA タイプの場合で 6 人となった。今回の使用細胞の HLA ハプロタイプにおいても非常に稀なタイプであった。

第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析 DNA-QC—

黒田ゆかり¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 九州ブロック血液センター

I. 部門別総合解析 (表記含む)

1. 概要

DNA-QC 参加施設は、昨年より 2 施設増加し 71 施設であり、部門別の参加施設数は、輸血部門 39 施設 (54.9%)、臓器部門 42 施設 (59.1%)、造血部門 27 施設 (38.0%) 及びその他 8 施設 (11.3%) であった。評価対象は例年通り HLA-A, B, C 及び DRB1 とし、DRB3/4/5, DQB1, DPB1, DQA1 及び DPA1 は対象外とした。ローカス別の参加施設数は、HLA-A 及び HLA-B が 71 施設 (100%)、HLA-C が 59 施設 (83.1%)、DRB1 が 69 施設 (97.2%) であった。

使用方法は、Luminex (SSO) 法を使用した施設 (他方法との重複含む) が全体の 71.8% と一番多かった。二番目に多いのは SSP で 28.2% であった。Luminex (SSO) 法による参加が増加傾向にある一方、SSP は 2013 年をピークにやや減少傾向にある。

今回の方法別解析では、参加施設が 1 施設であった INNO-LiPA を解析対象外とした。また、新たな試みとして Luminex (SSO) 法の参加施設には任意で陰性コントロールのデータを提出いただいたが、データを提出した施設は 51 施設中の 30 施設 (58.8%) であった。

詳細は、学会ホームページの第 20 回 QC ワークショップ報告集をご参照いただきたい。

2. 判定結果の評価

①各タイピング法での判定が正しいこと、②各タイピング法の結果が総合判定と祖語がないことの 2 つを評価項目とし、60 点満点で評価した。全施設の評価平均点は、59.56 点と概ね良好な結果を示した。各方法別解析を参考にさせていただきたい。

3. 結果表記の評価

HLA タイピング結果は、日本組織適合性学会で規定されている「HLA タイピング結果のアリル表記法と結果報告の原則 (2010 年度版)」*1 に基づき、①アンビギュイティ (ambiguity) の表記、② HLA 型への読替え、③ その他 DNA タイピング結果表記について 40 点満点で評価した。全施設の評価平均点は、39.36 点と良好な結果を示した。

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

表記に関して、減少している表記ミスと減少していない表記ミスがあり、特に減少していなかった以下の 3 点は、ホームページを参照し確認をお願いしたい。

- ①アソシエート抗原の読替え (A203, A2403 など)
- ②第 1 区域と HLA 型が異なる場合の読替え (B*15:XX, B*40:XX, C*03:XX など)
- ③「アリル //+」と「アリル /アリル /+」との区別

4. タイピング結果の評価 (総合評価)

総合評価点は、判定結果の評価 (60 点満点) と結果表記の評価 (40 点満点) の合計点であり、全施設の平均点は 99.0 点と良好であった。総合評価点 60 点未満の施設は無く、60 点以上 100 点未満が 25 施設、満点は 46 施設であった。

5. 試験結果の評価

試験結果の評価は、使用試薬での結果の妥当性を評価項目とし、反応データについて A (不備無し)、B (一部の不備)、C (全体的な不備) の 3 段階で評価を行った。C 評価はなかったが、B 評価が Luminex (SSO) で 3 施設、SSP で 2 施設の計 5 施設あり、データの確認をお願いしたい。

II. まとめ

DNA-QCにおいては、全体的に良好な結果が得られていた。正しく結果を報告するためには、「正確なタイピング」と「正しい報告」が必要である。

「正確なタイピング」には技術のみならず適した環境も必要である。陰性コントロールのデータは環境の指標

となるため、確認することには意義がある。

また、「正しい報告」には、自施設の使用試薬の原理や解像度及びそれらから導かれる結果や Ambiguity についても十分に理解しておく必要がある。今年度は、解析ソフトを用いていない施設のミスアサインや、カタログファイルの未更新による Ambiguity の差が見られ、“解析ソフトの適切な使用”が結果から見えた課題である。

第 20 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—

高山 智美¹⁾

¹⁾ 大阪急性期・総合医療センター

1. 概要

1) 参加状況

SSP 法の参加施設は 22 施設で昨年と同数であった。このうち 16 施設は臓器移植関連の施設であり、SSP 法において臓器移植部門の参加が多い傾向は続いている。

2) 使用試薬

MicroSSP の使用が多く、その中でも MicroSSP JPN が 17 施設で使用され最も多かった。中～高解像度の試薬の使用は 2 施設あり、すべて他法の補助試薬としての SSP の使用であった。また、4 種類の試薬で使用施設が 1 施設のため相対的評価ができなかった。

2. 解析方法

解析は以下の 4 項目について行った。

- 1) 反応データ
- 2) アリル判定
- 3) 結果の表記法
- 4) SSP 法の結果と総合判定の祖語の有無

詳細な結果データについては、学会ホームページの第 20 回 QC ワークショップ報告集をご参照いただきたい。

3. 結果と考察

- 1) 反応の不備 (false negative) による判定ミスが 1 施設あった。検査手技や判定方法などを見直し、原因の究

明が必要であると考えられる。反応データの記載ミスが疑われる施設が 2 施設あり、結果シートへの入力の際には注意が必要である。また、陰性はスコア 1 とすべきところを判定不能 (無反応) のスコア 0 と報告した施設が 3 施設あった。

- 2) アリル判定では、ワークシートによる判定が原因と考えられる判定ミスが 2 施設あった。ワークシートだけの判定で全ての ambiguity を網羅することは難しく、解析ソフトの使用が推奨される。また、解析ソフトを用いる場合でも、カタログファイルのバージョンが古い施設があり最新のバージョンで使用する必要があると考えられる。
- 3) 欠番や Null アリルの表記について確認が必要な施設が 2 施設あった。
- 4) SSP 法単独の参加施設で総合判定と祖語のある施設が 3 施設あった。記載ミスを含めて注意が必要である。

4. まとめ

本年度の SSP 法の結果は概ね良好であった。明らかな反応の不備が 1 施設、アリル判定のミスが 2 施設あり、検査方法や判定方法の見直しの必要があると考えられる。また、記載ミスが疑われる施設が散見されたので、記載ミスを防ぐ方法 (エクセルのコピー機能の利用等) を検討していただきたい。

第 20 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 (LABType) 法—

石塚 敏¹⁾

¹⁾ 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室

1. 参加状況

PCR—reverse sequence specific oligonucleotide (PCR-rS-SO) である LABType の参加施設は、本年度 11 施設であり部門別内訳は、臓器移植分野 6 施設、造血幹移植分野 6 施設、輸血関連分野 7 施設、その他分野で 1 施設の参加があった。(部門重複含む)

2. 検査状況

試薬キットは、LABType SSO 6 施設、LABType HD 7 施設、LABType XR 2 施設であった。HLA-A, B, DRB1 Locus は全施設で参加されていたが、HLA-C Locus 8 施設、HLA-DQ Locus 5 施設、HLA-DP Locus 3 施設の参加であった。また、今回新たな試みとした陰性 Control の確認には 2 施設の参加があった。

3. 表記法

日本人に限定した推定 4 桁アリルで ambiguity の記載がない報告結果を提出されている施設があった。学会に基づく表記法で確認すると A locus でアスタリスクがない、B locus でスラッシュがなかったり、Null 表記がされている施設もあった。C・DR・DQ・DP locus に関しては問題なかった。

Ambiguity に関しては、同一試薬・同一ロットでも異なる結果報告の施設があった。推定 4 桁アリルにおける結果として確認すると全ローカス・全施設において共通した推定 4 桁アリルの記載があり一致率 100% であった。詳細な報告結果については、学会ホームページに掲載されている「第 20 回 QC ワークショップ報告集」を参照して頂きたい。

4. Control Beads 反応性

各施設から提出して頂いた CSV ファイルを再解析し Control Beads 反応性を確認した結果、全ての locus において特に問題はなかった。また、今回新たな試みとした Control における Beads の確認においても問題はなかった。

5. cut-off 値の変更状況

各施設から提出して頂いた CSV ファイルを再解析し cut-off 値の変更状況を確認した。A・B・C・DR locus で解析に最大 2 箇所まで cut-off 値の変更を要する施設データがあった。DQ・DP locus では最大で 1 箇所であった。

6. ambiguity

同一試薬・同一ロットの DPB1 locus において 3 施設中 1 施設だけ ambiguity の記載があった。各施設から提出して頂いた CSV ファイルを比較すると Beads 73 が偽陽性を示した結果を生じた ambiguity であることが確認出来た。しかし、再解析結果を確認する限り Control 等の反応性は特に問題がなく原因不明であった。

7. まとめ

日本人に限定した推定 4 桁アリルで ambiguity の記載がない報告結果を提出されている施設があった。学会 DNA-QC では、日常 DNA タイピングで使用している試薬の解析結果を公認されたアリル全てに対して可能性のある組合せで表記することになっている。また、現在 DNA-QC では ambiguity まで評価対象ではないが、臨床現場において ambiguity まで臨床報告している施設は最新のカタログファイルのバージョンと nomenclature の database を確認して頂きたい。

第 20 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 (WAKFlow, Genosearch) 法—

奥平 裕子¹⁾

¹⁾ ジェノダイブファーマ (株)

1. 概要

1) 参加状況

全参加施設 71 施設中、Luminex 法での参加施設は 51 施設 (71.8%) であった。このうち、キットについては、WAKFlow を使用していた施設が 37 施設 (Luminex 法参加施設の 72.5%)、GenoSearch を使用していた施設が 5 施設 (Luminex 法参加施設の 9.8%) であった。また陰性コントロールのデータは 30 施設において提出された (Luminex 法参加施設の 58.8%)。

2) 対象ロークラス

HLA-A、-B 遺伝子座については全施設で実施されており、次いで HLA-DRB1 座は 49 施設、HLA-C 座は 43 施設となっていた。

2. 解析方法

ミスアサインもなく結果は概ね良好であったが、明らかに反応不良な施設や、陰性コントロールでの不良データが複数あった。

そこで、Luminex 法の作業工程を以下の 5 工程に分け、各工程の注意点について事例を挙げて示した。

- 1) PCR
- 2) ハイブリダイゼーション
- 3) 洗浄
- 4) 測定及び判定
- 5) 報告

3. 解析結果及び考察

- 1) PCR の工程では、以下の 2 点について示した。
 - 目的の遺伝子が増幅されているか?
 - 陰性コントロール (NC) 判定が行えているかどうか?

目的の遺伝子が増幅されているかについては、陽性コントロールビーズの蛍光値の平均値とばらつきのグラフで、他施設よりも平均値が低かった施設やばらつきが大きかった施設は、PCR の増幅が悪いことが原因でプローブの反応性が悪くなっていた。陰性コントロール判定が行えているかについては、陰性コントロールの全プローブの蛍光値の平均値とばらつきのグラフで高値であった施設では、多くのプローブが反応してしまっており、コンタミが疑われた。

2) ハイブリダイゼーションの工程では、Pmin/Nmax の比率が低値であった施設では、プローブの陽性、陰性の差が曖昧でプローブの反応性が悪く、ハイブリダイゼーション効率に問題があることが示唆された。

3) 洗浄の工程では、バックグラウンド値が高く洗浄操作に問題のある施設があった。この施設では、プローブの反応性が曖昧でその蛍光値は全体的に高値を示していた。

4) 測定及び判定の工程では、カットオフ値をアリル頻度によって意図的に変更していると思われる施設があった。また、多数のプローブのカットオフ値変更によって、判定している施設も複数あった。

5) 報告の工程では表記法に従った表記が出来ていない施設が多数見受けられた。

4. まとめ

本年度における Luminex 法 (WAKFlow, GenoSearch) の結果は、概ね良好であった。しかし、陰性コントロールでプローブが反応している施設や、多くのプローブのカットオフ値を変更している施設、表記法に従った表記が出来ていない施設があった。もう一度、各工程に操作の見直しを行い、タイピングの精度の向上に努めることが望まれる。

第 20 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 (Sanger, NGS) 法—

小島 裕人¹⁾

¹⁾ 公益財団法人 HLA 研究所

1. はじめに

SBT 法には、Sanger 法と NGS (Next Generation Sequencing) 法がある。2005 年の NGS 法の登場までは Sanger 法のみが利用可能であったが、NGS を用いた HLA タイピング試薬や読み取り機器の普及に伴って、特に諸外国では NGS が中心になってきている。我が国では、これまでに実施されているシーケンシングデータのほとんどが Sanger 法であり、NGS は諸外国ほど普及していない。

2. 参加施設・使用キット

SBT 法の QC 参加施設は、NGS 法が 3 施設、Sanger 法が 5 施設であった。

NGS 法は、3 施設とも使用キットが異なり、それぞれ TruSight HLA, ScisGo HLA, NXType NGS HLA であった。これらのうち、TruSight HLA, NXType NGS HLA は Long Range PCR を、ScisGo HLA は Short Range PCR を原理としている。測定機器に関しては、TruSight HLA, ScisGo HLA を使用した施設では MiSeq, NXType NGS HLA を使用した施設では IonPGM であった。

Sanger 法は、使用キットとして SeCore を用いた施設が 3 施設であり、他の 2 施設は AlleleSEQR であった。判定ソフトは、SeCore を用いた 3 施設が uTYPE, Allele SEQR を用いた 2 施設はそれぞれ、Assign, SBTengine であった。

3. 結果及び考察

1) NGS 法

各施設で使用キットが異なるため、施設間評価はできなかったが、以下の点は確認可能であり、すべての施設

で問題はなかった。

- ①キットが対象とする領域と、表記すべき区域の整合性
- ②他法でコンセンサスの得られている第 2 区域までの検査結果

2) Sanger 法

施設間でキットの違いがあり、対象領域について、Class I は exon 2 ~ 4 と揃っていたが、DRB1 座は 2 施設が exon 2 のみ、3 施設が exon 2, 3 と相違があった。そのため、DRB1 座に対する評価は、対象領域を加味して実施した。施設間で結果に相違のあった部分を以下に挙げる。

① Ambiguity

● Ambiguity 候補の見落とし

H2804 の A 座は、A*24:02/03/13/+, *33:03/10/11/+ がコンセンサスであるが、28D45 の結果は A*24:02/34/67, *33:03/11/53 であった。A*24:02, *33:03 と A*24:03, *33:10 の組み合わせでは、codon 166, codon 167 での Ambiguity が確認され、28D45 の施設は結果を表記する際に見落とししている可能性が高かった。

●最近追加されたアレルとの Ambiguity

H2802 の C 座は、C*08:01, *06:02 と C*08:118, *06:04:02 の組み合わせが Ambiguity の対象となる。しかし、第 2 区域が同じである C*08:118, *06:04:01 は対象から外れ、候補から除外される。また、C*06:04:02 は 2016 年 1 月に新規登録されたアレルで、参照とした塩基配列が古い可能性があり 28D45 と 28D63 の施設では C*08:118, *06:04 が候補に含まれていなかった。同様に H2803 の B 座、H2804 の B 座でも、それぞれ B*51:192 (2015 年 10 月新規登録)、B*15:197:02 (2016 年 1 月新規登録) が対象となっていた。

● DRB1 座 codon 86 の Ambiguity

H2801 の DRB1 座 は DRB1*04:03, *08:03 と DRB1*04:07, *08:10 の組み合わせが Ambiguity となり, codon 86 の組み合わせがそれぞれ GTG, GGT と, GGT, GTG であることに起因する。H2803, H2804 の DRB1 座 も同様に codon 86 に関連する Ambiguity となり, これらはキット付属のプライマーを用いることで解消できるが, 判定ソフトに Assign SBT を用いる場合は, 解析前に設定を行う必要がある。

28D45 の施設は付属プライマーを使用しているにもかかわらず, codon 86 に関連する Ambiguity が解消できておらず, 判定ソフトの設定をし忘れた可能性がある。

● プライマー設計部位または設計付近の Ambiguity

H2801 の DRB1 座においては, DRB1*08:03, *08:14 及び DRB1*08:03, *08:71 の組み合わせが, codon 12, codon 94 の塩基配列が異なることから候補から除外される。28D40, 28D63 の施設では絞り込みが行なわれていなかったが, 差異のある箇所がプライマー設計部位であることから, 逆方向の読み取りで不十分であった, または施設での判定基準で判別していないことが理由として挙げられた。同様に, H2802, H2803, H2804 の DRB1 座でも, Ambiguity の絞り込みに施設により差がみられた。

②判定ソフトの違い

H2804 の C 座は, 判定ソフトに uTYPE を用いた施設では C*03:46 が Ambiguity の候補に含まれていたが, Assign, SBT engine を用いた施設では候補に含まれていなかった。C*03:46 は C*03:04 を基本配列として, codon 54 が欠失したアレルであり, データからは否定されるアレルとなり, 結果の齟齬は判定ソフトの問題によるも

のと考えられる。

③表記

H2801 の DRB1 座は, 28D63 の施設で片方のアレルが DRB1*04:03 と表記されていた。DRB1*04:03 は検査対象領域に exon 2 が含まれる場合, codon 57 及び codon 58 の違いによって DRB1*04:03:01 と *04:03:02 を区別することが可能であるが, 第3区域の表記に関しては, 表記法の項目 III.1.2) には「第3区域でのアレルの細分化が知られている場合, アレルが特定できた場合にのみ第3区域までアレルを表記する。」とされており, 区別できる場合は表記することが望ましい。

H2802 の DRB1*10:01, H2803 の DRB1*04:05, H2804 の DRB1*14:05 も同様に, これらのアレルはそれぞれ, codon 72, codon 39, codon 58 の違いによって, 第3区域を判定することができる。

4. まとめ

NGS 法は, 各施設における使用キットが異なるため, 施設間差を評価できなかった。対象領域に対する結果表記の区域及び, 第2区域までの他法との整合性は取れていた。

Sanger 法では Ambiguity の相違がみられたが, 検査反応性によるものではなく, 結果書き込み時の候補見落とし, 参照配列が古い, Codon 86 を解析時に設定していないなどの判定に関する事項であった。Ambiguity 候補の見落としなどの人為的ミスに関しては, ダブルチェックなどが必要であり, 目視での判定や判断を伴わない, 参照配列や codon 86 による Ambiguity に関しては, それぞれキットのロットを最新にする, 判定前の設定を忘れないことが必要である。

第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —試料説明 抗体 QC—

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

昨年度から、QCWS に使用した試料について選定理由を説明し、各施設の結果や評価に役立つ情報提供を目指している。

抗体試料は、日本赤十字社に保管されている在庫量が十分な約 300 種類の HLA 抗血清について、学会から譲渡依頼の手続きを済ませ QCWS 用に確保してある。これらから、解析上の利点、施設認定、アンケートでの要望を考慮し、4 種類を 1 mL ずつ配布すること、日本人に通常検出される HLA 抗体であること、HLA-C 座抗原に対する抗体、IgM 性抗体、HLA 以外の非特異反応が含まれる場合があるといった要件で選定している。さらに、①抗体保有者の HLA 型が調べられていること、②過去に採用した特異性を極力避けること、③ HLA-Class I 及び Class II 特異性が含まれること、④検査法により特異性に差が生じる血清を選ぶことを努力目標としている。①～④の追加要件が意図するところは、通常では遭遇しづらい試料を実際に扱うことにより、日常使用している検査法の手技、解析、判定に問題点を見出し、知識、

技術の向上が図れる機会を提供することにある。また、日本移植学会で実施する全血クロスマッチの抗体試料を共通配布している関係で、全血検体の HLA 型との一致も考慮している。

今回採用した抗体試料は、HLA-DR1, DR10 の特異性を有する抗血清を中心に選んだ。このような抗体特異性は、エピトープの共通性から DR4, DR9 或いは DR51, DR53 の特異性を併せ持つことが多く、検出感度や利便性が高い水準で維持されている現在の抗体検査試薬でどのように判定されるか興味がある。さらに、仮想クロスマッチを行った場合、抗体検査試薬のみならず、HLA タイピング試薬でどのローカスを検査すべきかなど、さまざまな問題提起が期待できる。試料説明の詳細スライドは学会ホームページを参照していただきたい。また、今回の抗体試料を用いた各検査法の解析結果も本誌と学会ホームページに掲載されているので、併せて参照していただきたい。

第20回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析 抗体 QC—

高 陽淑¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

I. 総合解析（部門含む）

1. 参加施設の構成

今年度の抗体検査への参加は、輸血部門 36 施設、臓器移植部門 34 施設、造血細胞移植部門 24 施設（重複あり）の 58 施設（初参加は 3 施設）であった。施設別（病院・大学に属する施設、試薬メーカー・検査施設、血液センターなど）の参加割合もこれまでとおり病院・大学に属する施設が最も多く 70% 以上を占めていた。また部門別の参加構成を調査したところ、全部門への参加は 14 施設、単独部門への参加は 30 施設（輸血 13、臓器 17）で、例年通り造血部門には単独参加は無かった。

2. 抗体検出及び抗体特異性同定結果

全部門での抗体検出（抗体有無）結果の一致率は全検体（抗体試料 4 種類のクラス I & クラス II）において 100% の一致であり、抗体 QC において初の快挙となった。参加部門に関わらず HLA 抗体の有無については継続的に全施設一致となることが望まれる。

また、抗体特異性同定検査を実施した 42 施設中、40 施設は LABScreen や WAKFlow など Luminex で測定する蛍光ビーズ法を用いて結果判定を行っていた。使用試薬とその判定基準が同程度である施設の割合が高いことから特異性同定における一致率も例年以上に高かった（詳細は結果評価の項でも述べる）。

II. 結果評価

1. 抗体 QC 結果比較について

各施設から提出された総合判定結果について一致状況を調査した。具体的には各試料の判定スコアを集計して、完全一致を“1”としたときの割合を算出し試料間の一致率を比較した。その結果、クラス I 抗体では SH2802、

SH2803 が、クラス II 抗体では SH2801、SH2804 が比較的低かった。

次に、抗原ごとの判定スコア一致率を比較すると、抗体試料 4 種類の全抗原（クラス I 316 抗原、クラス II 96 抗原）のうち、一致率 0.9 未満となった抗原の割合は、クラス I が 16.1%、クラス II が 21.9%、一致率 0.9 以上ではクラス I が 35.1%、クラス II が 20.8% であった。これらの結果比較から、完全一致が得られないまでもクラス I 抗体特異性の同定結果は、より一致率が高い状況であることがわかる。また、クラス II 抗体特異性については、SH2801 を例とするように DR よりも DQ 抗体における判定の施設間差が大きい傾向にあった。詳細について学会の HP に掲載されている QCWS 解析結果を参照されたい。

2. 総合判定結果不一致の原因

不一致の原因を調査したところ、一致率が 0.9 以上かそれ未満かで原因が異なる傾向があった。以下にそれらを示す。

- ① LABScreen single antigen (LSSA) で測定した際に得られる nMFI が 1,000 ~ 3,000 の領域に含まれる場合。
- ② 用いる試薬 (LABScreen, WAKFlow HLA 抗体クラス I (HR) など) に含まれる抗原の差に依存する場合。
- ③ 一部の施設の反応性や陽性判定基準 (カットオフ) の差による場合。
- ④ 特定の施設の反応性が他施設と大きく異なる場合。
- ⑤ 入力ミス、判定ミスなどケアレスミスと考えられる場合。

これらのうち、一致率 0.9 未満では①~③が、0.9 以上では④、⑤が主な原因であると判断された。

3. 抗体 QC 部門別評価について

日本人 HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の HLA 抗原（結果

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

その結果、参加施設 58 施設のうち抗体検出については前述のとおり全施設 A 評価であった。

抗体特異性同定については、検査を実施した 42 施設中、評価 A が 40 施設 (95.2%)、評価 B、評価 C がともに 1 施設 (2.4%) であった。評価 B 以上の施設は、昨年 (19th) の 95.5% をさらに上回る結果 (97.6%) となった。

III. 結語

今回の抗体 QC における総合評価は、全体的にこれまでで最も良好な結果であった。この要因としては、昨年までの傾向と同様に特異性同定検査に用いた試薬が集約

化されてきたこと、またそれに伴う検査手技の精度向上や判定基準の大きな一致などが考えられる。しかし、その一方で継続参加している施設にもケアレスミスが散見されることから、年に一度のタイミングで実施される精度管理の機会を十分に生かして頂きたい。

今回の抗体 QC の結果を踏まえて、来年度以降は、アレルレベルの反応性差を有する抗体について抗原レベル判定で報告する際の考え方や、これまで比較対象外であった DP 抗原に対する抗体の判定結果比較などができるといった内容を取り入れる事を計画している。結果判定の比較検討と施設間差の原因調査に重点をおいていた抗体 QC から、HLA 抗体検査の目的を改めて整理し、その目的に適った検査項目での達成度を確認できるような抗体 QC へと変化していくことで、より臨床に即した (抗体検査の) 精度管理の一助となることを期待している。

第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 FCM (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. 参加状況

今回の QCWS で OneLambda 社 FlowPRA 法を使用した施設は、スクリーニングで Class I が 24 施設、Class II が 23 施設であった。シングルアンチゲンは昨年に続き参加施設はなかった。参加施設の内訳は例年と変わらず臓器移植部門での参加が多かった。

2. 測定機器と試薬ロット

測定機器、及び試薬ロットの詳細はホームページの解析資料を参照して頂きたい。

3. 解析方法

今回、配布試料 (SH2801) を用いて、同一条件下で FACS Calibur, FACS Canto II, Navios の 3 機種で測定し、%PRA に大きな差がないことを確認した。各施設からは RAW データも併せて提出頂き、解析ソフト Flow Jo, Kaluza で再解析を行い、%PRA、取り込みビーズ数等を確認した。

4. 解析結果

判定スコアの一致率はクラス I, II ともに 100% と良好だった。しかし、数施設においてビーズのゲート位置のズレ、取り込み数の設定により、十分なカウントに達していなかった。%PRA においてはマーカー設定が各施設により異なり、その結果、%PRA の値は、施設により大きく異なっていた。

5. まとめ

FlowPRA 試薬を用いた検査の判定スコアの一致率は前年度同様に 100% で、良好な結果であり問題は認めなかった。しかし、未だ %PRA は各施設において差を認めており、各施設でゲートの位置やコンペンセーションが適正か否か、マーカーの位置確認、各ビーズの取り込み数を改めて確認することが必要であると考えます。また、判定基準においては、%PRA のみで判定を行っている施設が数施設見受けられ、試薬メーカーが推奨しているヒストグラムでの判定への見直しをお願いしたいと思う。以上の事を注意し、再度機器設定の見直しを行い、次回の QCWS に望んで頂きたい。

第20回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 ルミネックス (LABScreen) 法—

蟹井はるか¹⁾, 前島理恵子¹⁾, 藤原 孝記¹⁾

¹⁾ 帝京大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター

1. はじめに

抗体 QC 参加施設は 58 施設で LABScreen を使用した施設は 39 施設 (67.2%) あった。

部門別参加状況は輸血関連 24 施設, 臓器移植 25 施設, 造血幹細胞 20 施設, その他 (メーカー, 検査会社) 2 施設あり, 複数の部門参加している施設は 21 施設 (53.8%) だった。

LABScreen の方法別実施状況は, スクリーニング検査に Mixd を用いた施設は 8 施設, Multi は 1 施設, PRA (Class I : 6 施設, Class II : 7 施設) があった。Mixd のみ参加施設が 1 施設, LABScreen Single Antigen のみ参加施設が 7 施設あった。Supplement beads を使用している施設は 12 施設あった。

2. 結果解析

1) 抗体の有無

配布された検体 SH2801, SH2802, SH2803 及び SH2804 の抗体の有無については, Class I, Class II 共に参加全施設において抗体ありと判定された。

2) 検体前処理

測定時の検体前処理方法は, 未処理, 非特異反応吸着処理, EDTA 添加, 凍結遠心, 複数組み合わせや, 検体毎に前処理が異なるなど, 施設により様々であった。

3) コントロールビーズの施設間差

各検体の Class I, Class II の Negative Control Beads の蛍光値を施設ごとに比較すると, Class I の SH2801 や SH2802 で 500 を越える施設があった。同様に各検体 Class I, Class II の Positive Control Beads の蛍光値を比較すると, S43 の施設は SH2801 Class I, Class II, SH2802 Class II で 1000 以下と低値を認めた。

4) PC/NC の比較

各施設の Raw data より得られた PC/NC 比は各検体 Class I, Class II 共に前処理による違いは認められなかった。

5) 測定値 (nMFI) 比較

S40 の施設で SH2801 Class I Supplement beads のデータの送付間違いがあった。

S43 の施設はすべてのデータにおいて nMFI が低いため, 他施設と比較すると検出できない抗体特異性が認められた。PC ビーズを含む, すべてのビーズの蛍光値が低いことから, 使用した二次抗体に問題があったと考えられた。

S35 の施設は NC ビーズの蛍光値が SH2801 : 1434, SH2802 : 723 と高いため, nMFI が低値傾向になったと考えられた。

S37 の施設はすべてのデータで nMFI が高値傾向であったが, 原因は分からなかった。

6) Consensus

各施設の総合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 LS-SA 実施施設の結果 70% 以上の一致を得られた抗体特異性を Consensus とした。

全ての検体で Consensus が得られていない抗体特異性が複数存在した。

SH2801 の DQ2, DQ7 抗体判定は判定スコア (8) が 22 施設, 判定スコア (1) が 10 施設, 判定スコア (4) が 2 施設, と Consensus が得られていなかった。LABScreen Single Antigen Class II の DQ2 及び DQ7 のビーズはそれぞれ 5 種類ずつあるが, DQA1 に対する抗体が存在する場合は一部のビーズで陽性になる可能性があることから, この様に異なるローカスに対する抗体が存在する場合の判定は注意が必要である。

7) カットオフ値

カットオフ値の設定はそれぞれ nMFI>1000, nMFI>1500, nMFI>3000, Mean>1000, Rxn, さらに各カットオフに加えエピトープを考慮した判定などであった。

3. まとめ

LABScreen 参加施設の抗体有無の一致率は Class I, Class II 共に 100% だったが、Consensus が得られていない抗体特異性 (SH2801 Class I : 3, Class II : 2, SH2802 Class I : 10, Class II : 2, SH2803 Class I : 7, SH2804 Class I : 3) が存在した。

Consensus が得られていない要因として、以下のことが考えられた。

- ①各施設の判定基準：カットオフ値は各施設によって異なるが nMFI>1000 で設定する施設が最も多かった。一致率の低い抗体特異性についてはエピトープを考慮した判定の必要性が示唆された。
- ②再検基準：一部の施設において、NC ビーズ、PC ビーズいずれもバラつきが認められ、メーカー推奨再検基準レベルのデータが存在した。
- ③入力ミスやデータの間違い：アレルにより反応が異なる場合の判定結果にバラつきが認められた。第 15 回の QC ワークショップにて同一抗原の複数アレルで結

果が異なる場合、1 つでもビーズが陽性になった場合は陽性と判定、あるいは判定保留として陽性扱いするべきとしている。

④検査手技

判定基準は検査目的により異なるが、QC ワークショップにおける一致率を上げるためには、学会推奨の判定基準を設けることが必要であると思われる。

4. エピトープ解析

LABScreen Single Antigen を実施した施設を対象にエピトープ解析を行った。判定スコア (8) の一致率と全施設の nMFI の平均を基に解析した。

一致率が高く、Consensus の得られた抗体特異性が認識するエピトープは、単独のアミノ酸を認識するものや、複数のエピトープを認識しているもの、 α ヘリックスに存在するものがあった。Consensus の得られていない抗体特異性が認識するエピトープは、複数の離れたアミノ酸を認識するものが多かった。アレルによりエピトープに反応しない抗体特異性があり、Consensus の得られない要因となっていたと考えられる。各施設のカットオフ値による判定に加え、エピトープを考慮した判定を行うことで、検出感度を落さずに判定することが可能であると考えられた。

第20回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 ルミネックス (WAKFlow) 法—

小林 洋紀¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター

1. はじめに

WAKFlow HLA 抗体検査試薬は、抗体検出用試薬の WAKFlow MR (クラス I・II) と抗体特異性検出用試薬の WAKFlow HR (クラス I) に分けられる。WAKFlow MR (以下 MR) の参加施設はクラス I が 16 施設、クラス II が 9 施設であり、WAKFlow HR (以下 HR) の参加施設は 11 施設であった。なお、解析結果の詳細は学会ホームページを参照されたい。

2. WAKFlow MR (クラス I・クラス II)

データ解析は、検体 SH2801～SH2804 の各試料において、各施設間の蛍光ビーズの Median 値及び Index 値の比較、Median 値の全施設平均の 2SD との比較を行った。クラス I の試薬ロットは全施設同一 (S0B) であったが、クラス II では 2 種類の試薬ロット (S0A, S0B) が使用されていた。血清処理方法は施設によって違いがみられた。

1) MR クラス I

- ① コントロールビーズの比較では、SH2801 において、吸収処理試薬の使用状況に施設間差が認められ、吸収の有無でバックグラウンドビーズ (以下 BB) の Median 値に差が認められた。
- ② S56 の施設は、試薬に添付されている二次抗体と異なる二次抗体を使用していたため、全体的に Median 値が他施設と比較して高値を示し、2SD から外れていた。
- ③ S31 の施設は、SH2802 において、全体的に Median 値が他施設と比較して低値を示し、2SD から外れていた。原因としては、二次抗体の分注不良や洗浄不良などが疑われる。

- ④ Median 値が 2SD を超えるものが散見されたが、Index 値では施設間に大きな差は無く、抗体検出結果は全施設一致していた。

2) MR クラス II

- ① コントロールビーズの比較では、クラス I と同様に、SH2801 において吸収の有無で BB の Median 値に差が認められた。
- ② S56 の施設はクラス I 同様に、全体的に Median 値が他施設と比較して高値を示し、2SD から外れていた。
- ③ 2 種類の試薬ロットが使用されていたが、特にロット間差は認められなかった。また、Median 値が 2SD を超えるものが散見されたが、Index 値では施設間に大きな差は無く、抗体検出結果は全施設一致していた。

3. WAKFlow HR (クラス I)

HR は、日本人遺伝子頻度 0.1% 以上のクラス I のアリルを網羅しており、抗体特異性検出用の試薬として、LABScreen Single Antigen と同様の特性を持つ試薬である。データ解析は、各施設間のビーズの Median 値及び 2SD の比較、Calmed 値で判定された抗体特異性の比較、MR と HR の反応性の比較について行った。

- ① SH2801 において、吸収処理の有無で BB の Median 値に差が認められ、2SD を外れる施設があった。吸収処理の有無は、判定結果に影響する可能性も考えられるため、吸収処理後の再検査をメーカーは推奨している。また、一部のビーズで Median 値が 2SD を外れる施設を認め、試薬のロット間差 (S0A, S0B, S0C) による影響と考えられた。
- ② Calmed 値が 5000 以上を示すビーズでの検出状況はほぼ一致しているが、5000 以下では検出状況にバラツキがみられた。また、吸収処理後の Calmed 値での

判定結果に乖離が生じる場合があり、弱陽性シグナルについては、手技や血清処理等に影響される可能性がある。

- ③ MR のカットオフ（初期設定）判定は、概ね HR の特異性と一致していると思われたが、HR の Calmed 値が 3000 以下の反応は、MR での検出は難しい場合があった。

4. まとめ

MR（クラス I・II）において、一部の施設で Median

値に乖離がみられたが、Index 値の施設間に大きな差は無く、抗体の有無の判定結果は全施設一致していた。HR でも MR と同様に一部の施設で Median 値に乖離がみられたが、Calmed 値での判定結果に影響は少ないと考えられた。また、Calmed 値が 5000 以下では検出状況にバラツキがみられるので判定の際には注意が必要である。なお、試薬の改良によって、ビーズの種類などの情報が変更されている場合があるため、旧ロットを使用される際においても注意が必要である。

第20回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 その他検査法及びクロスマッチ—

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. 参加状況の定義

その他検査法とダイレクトクロスマッチは、扱う抗体試料が異なるだけで検査法はほぼ共通であるため、次のように定義して参加状況を整理した。

① その他検査法：FlowPRA, LABScreen, WAKFlow 以外の HLA 抗体検査において、SH2801～SH2804 の 4 種類を対象としていること。

② ダイレクトクロスマッチ：LCT, FCM, ICFA などクロスマッチ可能な検査方法において、SH2801/HLA Class I を対象とし、クロスマッチ入力シートに記入されていること。

2. その他検査法

その他に分類される検査法は、LCT 法 (1 施設)、AHG-LCT 法 (1 施設)、MPHA 法 (3 施設)、ELISA 法 (1 施設)、ICFA 法 (1 施設) であり、もはや施設間の比較が困難な状況であった。学会ホームページ掲載資料にダイレクトクロスマッチと併せて詳細を掲載しているので、そちらを参照していただきたい。

3. クロスマッチ

クロスマッチは、27 施設の参加があり、4 施設がダイレクトクロスマッチのみでそれ以外の 23 施設が双方に参加した。

1) ダイレクトクロスマッチ

ダイレクトクロスマッチは、LCT 法 (4 施設)、AHG-LCT 法 (2 施設)、FCM 法 (7 施設)、ICFA 法 (12 施設) の参加であり、昨年より若干の増加であった。

LCT (CDC) 法は、確実な操作が保証されれば、補体活性を含む生体内反応をより忠実に再現可能な方法とい

える。AHG-LCT (AHG-CDC) 法は、LCT 法と FCM 法の中間に位置する検出感度を示すが、補体依存性と補体非依存性の抗体を両方とも検出するため、結果の解釈には注意が必要である。実際には、細胞の状態、ウサギ補体の細胞毒性、反応時間・温度、判定規準など不確定要素が多く、統一できているとはいいがたい。しかしながら、各結果は試料選定時の特異性とほぼ一致しており、一部で不明な反応が見られるものの必ずしも悲観的な結果にはなっていない。したがって、先に述べた不確定要素の一つ一つの統一が図れば、結果の正確性と整合性が期待されるであろう。

MPHA 法は、以前の QCWS 結果から感作粒子の反応時間の違いが結果に影響したと思われたが、今回、感作時間は統一されているにもかかわらず、結果の不一致が認められる。クロロキンの処理と未処理においても参加 2 施設が逆の傾向であり、血小板特異抗体検出を主目的とする本法において、HLA 特異性を検出するには、もはや無理があると言わざるを得ない。

FCM 法も統一した抗原細胞を使用していないため、一概に結果の比較評価はできないが、各ヒストグラムの形状や S/N 比に基づく判定結果を見る限り大きな問題点はないといえる。注意すべきは、測定細胞数が少ない施設は、ヒストグラムの乱れが認められる点と、判定規準が完全に統一されていない点で、これらはグレーゾーン近辺の反応において判定結果に影響する可能性があると思われる。

ICFA 法は、操作手順及び判定規準が統一されているため、結果の整合性はもっとも高いといえる。その中で、使用する血液細胞によってはバックグラウンド・シグナルが上昇し、計算上でインデックス値の低下を招くことがあるため注意すべきである。Cw7 特異性において、

ICFA 法低値と FCM 法高値という差が認められ、抗体をルミネックス・ビーズ上で濃縮する ICFA 法が高値になると予測されるが、逆の結果になった理由は不明である。

ダイレクトクロスマッチ各法は、本稿で定義する「その他検査法」とはほぼ同一であり、移植・輸血免疫において、生体内反応をダイレクトに観察できる有力な手段といえる。これら Cell Base Assay は、移植・輸血医療の貢献度が高く、今後もその技術水準の維持・向上に努めていくべきと思われる。

2) 仮想クロスマッチ

仮想クロスマッチは、抗体試料 (SH2804) と 2 本の DNA 試料 (H2803, H2804) を指定し、今回から HLA クラス II も対象とした。

SH2804 のクラス II 抗体特異性は、DR1, DR10 に加え DR51, DR53 を高力価で保有するが、DR51, DR53 と連鎖の強い DR15, DR4 は反応しない。H2803 は DR15-DR51, DR4-DR53 の HLA 型であるため、ダイレクトクロスマッチを行った場合は DR51, DR53 との反応で陽性になる。一方、この組み合わせで仮想クロスマッチを行っ

た場合、DNA 試料の DRB1 アリルしか検査していない施設は陰性判定、DRB3/4/5 までタイピングした施設は陽性判定となる。しかしながら、DRB3/4/5 をタイピングしていない幾つかの施設が二つの理由で陽性判定とした。一つは DR4 の蛍光値が若干 1000 を超え DR4 を「反応が予測される抗体特異性」とした施設、もう一つは抗体特異性と DR15-DR51, DR4-DR53 連鎖から反応を予測した施設である。後者は非常に重要であり、検査だけで判らない結果を HLA システムの知識で予測し、追加検査のきっかけを持たせたことにある。今回の例は、DR51, DR53 の高力価抗体が実際の移植医療でどの程度影響するか不明ではあるが、知識不足が患者の不利益になりうる良い例と言えないだろうか。

仮想クロスマッチは、確実な HLA タイピングと抗体検査に加え、HLA の知識が重要な要素といえる。毎回、フルローカスの HLA タイピングと Single supplement まです使用する抗体検査は必ずしも実施できないので、仮想クロスマッチは、それを補う知識と注意力を鍛えるには格好の場といえる。

第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —日本移植学会連携 全血クロスマッシャー—

橋口 裕樹^{1,2)}

¹⁾ 福岡赤十字病院 検査部移植検査課 / 輸血細胞治療部 / 事務部医療連系課

²⁾ 日本移植学会 移植関連検査委員会 委員

1. 概要

平成 25 年 4 月より日本組織適合性学会と日本移植学会が連携し、全血試料由来のリンパ球を用いたクロスマッシャーの精度管理を試行的に実施する事となり、今回で 4 回目の実施となった。

2. 経過

昨年より、参加申し込みが QCWS と共通になり学会ホームページより申し込み可能となった。これを機に、参加数は徐々に増え、今年度は 43 施設の参加があり過去最多であった。

参加施設内訳は、臓器移植ネットワークの検査施設が 25 施設、移植関連病院が 10 施設、検査センター 3 施設、血液センター 3 施設、試薬メーカー 1 施設、研究所 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 28 年 4 月に QCWS 試料を配布するのに合わせ、血清配布の翌々週に全血を参加施設に配布した。ACD-A 液入全血の発送には、東京より宅配便（常温）で発送、全国の参加施設には翌日、翌々日には到着し、細胞の生存率も概ね良好であった。9 月に集計結果を各施設にメールで送信、9 月に開催された第 52 回日本移植学会総会（東京都）、10 月に開催された第 20 回 QCWS（札幌市）にて報告を行った。尚、29 年 2 月に開催される第 50 回日本臨床腎移植学会（神戸市）でも報告予定である。

3. 試料選択及び検査方法

ドナー全血は、日本移植学会移植関連検査委員会で採血した ACD 採血 7.5 ml を準備した。ドナー HLA タイプは、日本人に高頻度に発現しているものを選択した。血清は、QCWS 部会で準備された SH2803, SH2804 を

選択した。SH2803 は HLA-Cw 抗体 (C*07:02, C*12:02) -DP 抗体 (DPB1*05:01), SH2804 は DR51 抗体 (DRB5*01:02) がドナー特異的抗体 Donor Specific Antibody; DSA となる想定で選択した。

検査方法は各施設で日常的に行っている方法を選択可とした。今回、初の試みとしてクロスマッシャープロトコル（案）を作成し、任意参加で 27 施設から測定データを送って頂いた。方法別にみると、フローサイトクロスマッシャー Flow Cytometry Cross match; FCXM 法が参加施設の 72% と最も多く、次いでリンパ球細胞傷害試験 Complement dependent cytotoxicity; CDC 法が 42%, Immunocomplex capture fluorescence analysis; ICFA 法が 33% であった。

4. 結果

各方法で SH2803, SH2804 とともに高い一致率であったが、一部の施設においては結果の誤入力と思われるもの認められた。FCXM において乖離した施設もあり、カットオフに起因するもの、機器設定に起因するものを認められた。CDC においては、B リンパ球を用いた方法で施設間差が大きかった。詳細な各方法の一致率は、学会ホームページを参照して頂きたい。

5. まとめ

今回も高い一致率の結果であったが、一部に施設においては問題となる判定も散見した。初の試みであった今回のクロスマッシャープロトコル（案）は、主に反応させる細胞数を指定したまでにとどまり、詳細な反応条件には踏み入って内容ではなく、プロトコル（案）を使用することで大幅な施設間差の是正にはつながってはいなかった。今後は、プロトコルに修正を加え、全血を用いたクロスマッシャーの精度管理を推進していきたいと考える。