

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過および 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 29 年 1 月に第 21 回 HLA-QCWS の開催および参加案内を、学会誌および学会公式サイトに掲載し、平成 29 年 2 月までに 81 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 : 74 施設, 抗体 QC : 57 施設, クロスマッチ (日本移植学会連携クロスマッチ含む) : 54 施設である。また, QCWS 参加希望施設からの連絡およびデータ収集等については、電子メールで対応した。

DNA-QC および抗体 QC に用いる試料の選択は、第 25 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い行った。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 10 日付で参加施設宛てに試料の発送, QCWS 結果入力用のシートファイルをメール配信した。同時に DNA タイピングと抗体検査の参考プロトコル集を学会公式サイトに掲載した。結果提出の締切りを 5 月 27 日に設定し、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、7 月 5 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 29 年 9 月下旬までに、最終報告データを作成し、解析結果を学会公式サイトに公開し、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 集会で報告および本学会誌 (MHC) への掲載を行った。

この期間中、DNA タイピング結果の表記法ワーキンググループを 4 名の部会員で立上げた。次年度からの導入を目指し、アレル表記法改定について入念に協議を重ね、改定案を QCWS 集会で報告した。

2. QCWS のテーマおよび試料選択について

DNA-QC のテーマは、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。DNA 試料は、細胞バンクから購入済の細胞について、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

[#] 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

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

¹⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所, ²⁾ 日本赤十字社 九州ブロック血液センター, ³⁾ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター, ⁴⁾ 日本赤十字社 福岡赤十字病院, ⁵⁾ 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, 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⁾ 日本赤十字社 北海道ブロック血液センター, ⁸⁾ 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態分野, ⁹⁾ 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室, ¹⁰⁾ 湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部, ¹¹⁾ 東海大学 医学部 血液腫瘍内科, ¹²⁾ 愛知医科大学 医学部 外科学講座, ¹³⁾ 公益財団法人 HLA 研究所, ¹⁴⁾ 帝京大学 医学部付属病院 輸血部

表1 第21回 HLA-QCWS 参加施設

| | | |
|----|-----------------------|-------------------|
| 1 | 株式会社 ベリタス | バイオサイエンス本部 技術グループ |
| 2 | NPO法人腎泌尿器疾患研究所 | |
| 3 | 福島県立医科大学附属病院 | 輸血・移植免疫部 |
| 4 | 株式会社ビー・エム・エル | 第三検査部 ゲノム検査課 |
| 5 | 富山大学附属病院 | 検査・輸血細胞治療部 |
| 6 | 日本赤十字社東北ブロック血液センター | 検査一課 |
| 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 | 株式会社 医学生物学研究所 | 品質管理部 |
| 9 | 日本赤十字社 九州ブロック血液センター | 検査二課 |
| 10 | 北海道大学病院 | 検査・輸血部 |
| 11 | 株式会社 エスアールエル | 品質保証部 |
| 12 | 北里大学病院 | 輸血部 |
| 13 | 社会医療法人 北輪会 札幌北輪病院 | 臨床検査科 |
| 14 | 鹿児島大学病院 | 輸血・細胞治療部 |
| 15 | JCHO 中京病院 | 検査部 |
| 16 | 九州大学病院 | 遺伝子・細胞療法部 |
| 17 | 三重大学医学部附属病院 | 輸血部 |
| 18 | 大阪府立大学医学部附属病院 | 輸血部 |
| 19 | 帝京大学医学部附属病院 | 輸血・細胞治療センター |
| 20 | 名古屋第二赤十字病院 | 医療技術部 |
| 21 | 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 |
| 22 | 札幌医科大学附属病院 | 検査部 輸血係 |
| 23 | 東邦大学医療センター大森病院 | 輸血部 |
| 24 | 山形大学医学部附属病院 | 輸血・細胞治療部 |
| 25 | 佐賀大学医学部附属病院 | 輸血部 |
| 26 | 公益財団法人 鹿嶋郷賢研究所弘前病院 | HLA検査室 |
| 27 | JCHO仙台病院 | 統括診療部臨床検査科診療部 |
| 28 | 岐阜大学医学部附属病院 | 検査部 |
| 29 | 宮崎県立宮崎病院 | 臨床検査科 |
| 30 | 香川県立中央病院 | 中央検査部 |
| 31 | 医療法人 鉄蕉会 亀田総合病院 | 腎移植科 |
| 32 | 公立大学法人 横浜国立大学附属病院 | 輸血・細胞治療部 |
| 33 | 岩手医科大学附属病院 | 中央臨床検査部 輸血検査室 |
| 34 | がん・感染症センター 都立駒込病院 | 輸血・細胞治療科 |
| 35 | 湧永製薬株式会社 | 試薬・診断事業部 |
| 36 | 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 |
| 37 | 愛知医科大学 | 腎移植外科・腎疾患・移植免疫学講座 |
| 38 | 熊本大学医学部附属病院 | 中央検査部 |
| 39 | 大分県立病院 | 輸血部 |
| 40 | 東京女子医科大学 | 中央検査部 移植関連検査室 |

(受付日付順)

| | | |
|----|------------------------------|-----------------|
| 41 | 独立行政法人国立病院機構千葉東病院 | 臨床検査科 |
| 42 | 松江赤十字病院 | 検査部 |
| 43 | 関西医科大学附属病院 | 輸血・細胞療法部 |
| 44 | 長崎大学病院 | 細胞療法部 |
| 45 | NHO米子医療センター | 臨床検査科 |
| 46 | 自治医科大学附属病院 | 輸血・細胞移植部 |
| 47 | 熊本赤十字病院 | 検査部 輸血係 |
| 48 | 岡山大学病院 | 輸血部 |
| 49 | 株式会社リプロセル | メディカル部 |
| 50 | 秋田大学医学部附属病院 | 腎疾患先端医療センター |
| 51 | 愛媛県立衛生環境研究所 | 疫学情報科 |
| 52 | 山形県立中央病院 | 輸血部 |
| 53 | 株式会社 LSIメディアエンス | 遺伝子解析部 遺伝子検査G |
| 54 | 株式会社 保健科学研究所 | GAU |
| 55 | 静岡県立総合病院 | 検査部検査技術室 |
| 56 | 徳島大学病院 | 輸血・細胞治療部 |
| 57 | 県立広島病院 | 臨床研究検査科 |
| 58 | 日本赤十字社中四国ブロック血液センター | 検査一課 |
| 59 | 沖縄県立中部病院 | 検査科 HLA検査 |
| 60 | 市立札幌病院 | 検査部 |
| 61 | 国立研究開発法人 国立循環器病研究センター | 臨床検査部 輸血管理室 |
| 62 | ジェノタイプファーマ株式会社 | ゲノム解析部門 |
| 63 | 東海大学医学部附属病院 | 臨床検査技術科 輸血室 |
| 64 | 福岡赤十字病院 | 検査部 移植検査課 |
| 65 | 京都府立医科大学附属病院 | 輸血・細胞療法部 |
| 66 | 筑波大学 | 消化器外科研究室 |
| 67 | 宮崎大学医学部附属病院 | 輸血・細胞治療部 |
| 68 | 獨協医科大学病院 | 臨床検査センター |
| 69 | 公益財団法人HLA研究所 | 研究検査課 |
| 70 | 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 |
| 71 | 岡山医療センター | 臨床検査科 |
| 72 | 金沢医科大学病院 | 北陸腎移植HLA検査センター |
| 73 | 東京大学医学部附属病院 | 輸血部 |
| 74 | 関東甲信越ブロック血液センター | 検査部検査三課 |
| 75 | 旭川医科大学病院 | 臨床検査・輸血部 |
| 76 | 広島大学病院 | 診療支援部 遺伝子細胞療法部門 |
| 77 | 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 | 難病資源研究室 |
| 78 | 日本赤十字社 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 |
| 79 | 北海道ブロック血液センター | 品質部検査一課 |
| 80 | 信州大学医学部附属病院 | 輸血部 |
| 81 | 京都大学医学部附属病院 | 輸血細胞治療部 |

あること」の要件に合う4種類を選定した。これらを培養した後、抽出したDNAを約100 ng/μLの濃度で100 μL (SSP実施施設は倍量) ずつ配布した。これとは別に、SSOルミネックス法の陰性コントロール (DNase free water 50 μL) を配布し、各施設で陰性コントロール・データの取得を必須とした。

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点とした。抗体試料は、本学会から提供依頼した日本赤十字社に保管してある献血者由来の抗血清について、「日本人に通常検出される抗HLA抗体であること」、「一部の試料では、HLA-C座抗原に対する抗体、IgM性抗体、HLA以外の非特異反応が含まれる場合がある」ことを要件とし、ダイレクトクロスマッチ、仮想クロスマッチおよび移植学会連携クロスマッチを考慮し4種類を選定した。これらを血清処理した後、各施設に1 mL ずつ配布した。

クロスマッチについては、本年も参加希望施設からの募集参加として以下の2通りで実施することを提示し、それぞれ参加申込み時に受け付けた。

①配布検体の一部を使用しクロスマッチを正確に行える

ことをテーマとして、指定した抗体試料と各施設で準備した細胞でHLAクラスIを対象としたダイレクトクロスマッチ

②抗体とDNAの結果から正しく適合判定が行えることをテーマとして、指定した抗体試料とDNA試料の測定結果によるHLAクラスIとクラスIIを対象とした仮想クロスマッチ

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. 解析報告と担当者

解析担当者は前年度と同一の担当者に早期に再依頼した。解析結果の公表は、QCWS集会での報告、学会公式サイトへの掲載、データ集 (CD-R) の配布、学会誌への掲載の4通りとした。

QCWS集会では、DNAタイピング結果解析と抗体検査結果解析に分け、それぞれ試料説明、検査方法別解析、総合解析の順に報告し、最後に総合討論と質疑応答の時間を設けた。報告内容の効率化を図るため、あらかじめ担当者別に解析ポイントをとりまとめ、討論・質疑の時間が多く取れるように努めた。DNA-QCでは、表記法と評価点の解説後、カットオフ変更を討論・質疑のテー

マとした。抗体 QC では、部門別の動向分析と評価点の解説後、抗体特異性の試薬間差、Ig サブクラスの判定意義などを討論・質疑のテーマとした。

前島理恵子

各解析分担項目と解析担当者および所属は、以下のとおりである。

1) DNA タイピング結果解析

- ・ 試料説明, 総合解析

九州ブロック血液センター 黒田ゆかり

- ・ SSP 法 大阪急性期・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[※]

ジェノダイブファーマ 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, 総合解析

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

- ・ 抗体ルミネックス法①[#]

関東甲信越ブロック血液センター 小林 洋紀

- ・ 抗体ルミネックス法②[#]

帝京大学医学部附属病院 蟹井はるか

- ・ その他, クロスマッチ

帝京大学医学部附属病院 藤原 孝記

- ・ 移植学会連携全血クロス

福岡赤十字病院 橋口 裕樹

[※]SSO ルミネックス法 ① LABType, ② WAKFlow/GenoSearch

[#]抗体ルミネックス法① WAKFlow, ② LABScreen

4. QCWS 試料の総合結果

配布した DNA およ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。DNA 試料は、Ambiguity の回避と NGS の phasing 結果を検証する理由で、HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 (H2902 未実施), DPB1 アレ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 3.28.0 (2017-04) を参照ライブラリーとして塩基配列をダイレクト・シーケンスした。これらの結果と参加各施設の結果を合わせて総合的にリアサインした。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)。

表 2 第 21 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 | |
|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|-------------------------|
| H2901 | A*11:01:01:01 | A*24:02:01:01 | B*15:02:01 | B*52:01:01:02 | C*08:01:01 | C*12:02:02:01 |
| | A11 | A24 | B75 | B52 | Cw8 | Cw12[※] |
| H2902 | A*31:01:02:01 | A*33:03:01 | B*39:02:01 | B*44:03:01:01 | C*07:02:01:01 | C*14:03 |
| | A31 | A33 | B3902 | B44 | Cw7 | Cw14[※] |
| H2903 | A*01:01:01:01 | A*02:01:01:01 | B*37:01:01 | B*40:02:01 | C*03:04:01:02 | C*06:02:01:01 |
| | A1 | A2 | B37 | B61 | Cw10 | Cw6 |
| H2904 | A*02:07:01 | A*33:03:01 | B*40:03 | B*46:01:01 | C*01:02:01 | C*03:04:01:02 |
| | A2 | A33 | B61 | B46 | Cw1 | Cw10 |

| HLA-Class II | HLA-DR | | HLA-DQ | | HLA-DP | |
|--------------|--|--|--|---|---|---|
| H2901 | DRB1*12:02:01 DRB3*03:01:03 DR12 DR52 | DRB1*15:02/140 DRB5*01:02 DR15 DR51 | DQA1*01:03:01 DQB1*03:01:01 DQ7 | DQA1*06:01:01 DQB1*06:01 DQ6 | DPA1*01:03:01 DPB1*09:01:01 DPw9[※] | DPA1*02:01:01 DPB1*21:01 DPw21[※] |
| H2902 | DRB1*09:01/21 DRB3*03:01:01 DR9 DR52 | DRB1*13:02:01 DRB4*01:03:02 DR13 DR53 | DQA1*01:02:01 DQB1*03:03:02 DQ9 | DQA1*03:02 DQB1*06:04:01 DQ6 | DPA1*01:03:01 DPB1*02:01:02 DPw2 | - DPB1*04:01:01:01 DPw4 |
| H2903 | DRB1*08:02:01 - DR8 - | DRB1*10:01:01:01 - DR10 - | DQA1*01:05:01 DQB1*03:02:01 DQ8 | DQA1*03:01:01 DQB1*05:01:01 DQ5 | DPA1*01:03:01 DPB1*02:01:02 DPw2 | - - - |
| H2904 | DRB1*08:03:02 DRB3*02:02:01 DR8 DR52 | DRB1*14:05:01 - DR14 - | DQA1*01:04:01 DQB1*05:03:01 DQ5 | DQA1*01:03:01 DQB1*06:01:01New # DQ6 | DPA1*01:03:01 DPB1*02:02 DPw2 | DPA1*02:02:02 DPB1*04:02:01:01 DPw4 |

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
C to T substitution at 493 (R to W at codon 133) in DQB1*06:01:01 exon 3

表3 第21回 HLA-QC ワークショップレポート：抗体サンプルの総合結果

日本人HLA遺伝子頻度0.1%以上の抗原に対する反応

| Sample | Antigen | Score |
|--------|---------|-------|
| SH2901 | A1 | 4 |
| | A2 | 1 |
| | A3 | 1 |
| | A11 | 1 |
| | A24 | 1 |
| | A26 | 1 |
| | A30 | 8 |
| | A31 | 8 |
| | A33 | 8 |
| | B7 | 1 |
| | B13 | 8 |
| | B27 | 8 |
| | B35 | 8 |
| | B37 | 8 |
| | B38 | 8 |
| | B39 | 8 |
| | B44 | 8 |
| | B46 | 1 |
| | B51 | 8 |
| | SH2902 | A1 |
| A2 | | 1 |
| A3 | | 1 |
| A11 | | 1 |
| A24 | | 1 |
| A26 | | 1 |
| A30 | | 8 |
| A31 | | 8 |
| A33 | | 8 |
| B7 | | 8 |
| B13 | | 8 |
| B27 | | 8 |
| B35 | | 8 |
| B37 | | 8 |
| B38 | | 8 |
| B39 | | 8 |
| B44 | | 8 |
| B46 | | 8 |
| B51 | | 8 |
| SH2903 | | A1 |
| | A2 | 8 |
| | A3 | 8 |
| | A11 | 8 |
| | A24 | 8 |
| | A26 | 8 |
| | A30 | 1 |
| | A31 | 1 |
| | A33 | 1 |
| | B7 | 8 |
| | B13 | 8 |
| | B27 | 8 |
| | B35 | 8 |
| | B37 | 8 |
| | B38 | 8 |
| | B39 | 8 |
| | B44 | 8 |
| | B46 | 8 |
| | B51 | 8 |
| | SH2904 | A1 |
| A2 | | 8 |
| A3 | | 8 |
| A11 | | 8 |
| A24 | | 4 |
| A26 | | 1 |
| A30 | | 1 |
| A31 | | 1 |
| A33 | | 1 |
| B7 | | 1 |
| B13 | | 1 |
| B27 | | 1 |
| B35 | | 1 |
| B37 | | 1 |
| B38 | | 8 |
| B39 | | 8 |
| B44 | | 1 |
| B46 | | 1 |
| B51 | | 1 |
| B52 | | 1 |
| B54 | 1 | |
| B55 | 1 | |
| B56 | 1 | |
| B58 | 1 | |
| B59 | 1 | |
| B60 | 1 | |
| B61 | 1 | |
| B62 | 1 | |
| B67 | 4 | |
| B71 | 1 | |
| B75 | 1 | |
| CW1 | 1 | |
| CW4 | 1 | |
| CW5 | 1 | |
| CW6 | 8 | |
| CW7 | 8 | |
| CW8 | 8 | |
| CW9 | 1 | |
| CW10 | 1 | |
| CW11 | 1 | |
| CW12* | 8 | |
| CW14* | 1 | |
| CW15* | 1 | |
| DR1 | 8 | |
| DR2 | 8 | |
| DR3 | 8 | |
| DR4 | 8 | |
| DR7 | 8 | |
| DR8 | 8 | |
| DR9 | 1 | |
| DR10 | 1 | |
| DR11 | 8 | |
| DR12 | 8 | |
| DR13 | 8 | |
| DR14 | 8 | |
| DR15 | 8 | |
| DR16 | 8 | |
| DR17 | 8 | |
| DR51 | 8 | |
| DR52 | 8 | |
| DR53 | 8 | |
| DQ2 | 1 | |
| DQ4 | 1 | |
| DQ5 | 1 | |
| DQ6 | 1 | |
| DQ7 | 1 | |
| DQ8 | 1 | |
| DQ9 | 8 | |

抗体QC参加施設の総合判定結果を基準とした
 ■ Score8:陽性=2/3以上の参加施設が陽性判定した抗原
 ■ Score4:保留=陽性・陰性どちらも2/3に達しない抗原
 □ Score1:陰性=2/3以上の参加施設が陰性判定した抗原
 * 暫定的なHLA抗原名 (WHO未公認)

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について記載した。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（表3）。

以上の総合結果で各施設の提出データを再確認いただき、今回の残余試料を今後の精度管理および技術向上に活用していただきたい。

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート — 試料説明 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

1. 使用する試料について

日本組織適合性学会では、DNA-QC の試料として使用する細胞を市販品あるいはバンクに寄託された匿名化した細胞から入手しストックしている。また、その年に使用する細胞は、HLA-A, B, C, DRB1 のタイピングデータを基に QCWS 集会でのアンケート調査結果を参考にして選択している。

2. 21stDNA-QC 細胞選定時のポイント

今回使用した細胞は、以下に示す 3 つのポイントから選択した。

① 低頻度アレル：QCWS のアンケートでは稀なタイプを希望するとの回答が増加傾向にあり、「稀なタイプを判定できること」を課題とした。

② ハプロタイプ：日本人集団において典型的なハプロタイプを有するものを選択し、「ハプロタイプの確認」や「ハプロタイプの認識」を課題とした。

H2901 の A*24:02-C*12:02-B*52:01-DRB1*15:02 は、日本人集団においてハプロタイプ第 1 位、H2902 の A*33:03-C*14:03-B*44:03-DRB1*13:02 は第 2 位、H2904

の A*02:07-C*01:02-B*46:01-DRB1*08:03 は第 5 位である。H2903 の A*01:01-C*06:02-B*37:01-DRB1*10:01 は稀なアレル A*01:01 および DRB1*10:01 を含むが高い連鎖不平衡が見られるものである。

③ HLA 型への読替え：遺伝子型の第 1 区域と HLA 型が異なるタイプを有するものを選択し「HLA 型の知識」を課題とした。

3. 配布サンプル

今回は DNA (100 ng/μL) 4 サンプルに加え、陰性コントロールとして DNase free water を配布した。陰性コントロールは SSO 法で用いるものであるが、20thQCWS では配布せずにデータ提出も任意としていたが、今回は陰性コントロールを配布し必須とした。なお、陰性コントロールのデータは、解析には使用するが評価の対象外である。

4. 新規アレル

前回は DPA1 で新規アレルが判定されたが、今回のサンプルからも NGS において DQB1 で新規アレル DQB1*06:01:01V (codon 133 CGG → TGG) が検出された。

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析（表記含む） 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

1. 概要

DNA-QC 参加施設は、毎年少しずつであるが増加している。今年は、昨年より 3 施設増加し 74 施設の参加があり、部門別の参加施設数は、輸血部門 46 施設 (52.7%)、臓器部門 46 施設 (62.2%)、造血部門 27 施設 (41.9%) およびその他 6 施設 (8.1%) であった。評価対象は例年通り HLA-A, B, C および DRB1 とし、DRB3/4/5, DQB1, DPB1, DQA1 および DPA1 は対象外とした。

Luminex (SSO) 法の参加施設には陰性コントロールを必須としたが、データを提出した施設は 52 施設中の 49 施設 (94.2%) であった。

詳細は、学会公式サイトの第 21 回 QC ワークショップ報告集をご参照いただきたい。

2. 評価

1) 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齟齬がないことの 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、58.48 点と概ね良好な結果を示した。各方法別解析を参考にしていきたい。

2) 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レル表記法と結果報告の原則 (2010 年度版)」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、39.78 点と良好な結果を示した。

3) タイピング結果の評価点 (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 98.3 点と良好であった。総合評価点 60 点未満の施設が 1 施設あったが、結果の転記ミスであったため報告前の最終確認を行うことで改善可能である。

4) 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 5 施設、SSP で 7 施設の計 12 施設あり昨年より増加していた。

3. 新規アレルについて

前回に続き今回も新規アレルが検出されていたが、検査をしていく上で新規アレルに遭遇する機会は決して稀ではなく誰でも遭遇する可能性がある。

SSP や SSO は既知アレルに対応するように製造された試薬であり、今回の新規アレルは検出されなかった。今回は検出されなかったが、試薬のプライマーやプローブ部分にバリエーションがあるアレルの場合は、既知の反応パターンと異なることや弱い反応となることなどもあるため注意が必要である。

Sanger 法では、class I の Exon4、class II の Exon3 未登録問題が浮き彫りになった。自動判定でミスマッチ 0 (Exon3 未登録) のアレルの組合せが 1 組あったが、この問題を考慮し総合的に新規アレルの存在を示唆した施設の HLA に関する意識の高さが見られたことは大変注目した部分であった。

4. まとめ

1) サンプル選定から見た結果

サンプル選定時のポイント①の稀なアレルについては、特に問題なく判定されていた。ポイント②のハプロタイプについては、転記ミスをしている施設が複数あり、それらの施設ではハプロタイプを意識しながら最終結果の確認をすることで対応できたと思われた。ポイント③の HLA 型への読替えでは、第 1 区域と異なるスプリット抗原やアソシエート抗原が正しく読替えられていない施設が多く、改善が見られなかった。

2) 報告結果から見えた課題

これまでも、正しく結果を報告するためには、「安定した技術」と「HLA に関する知識」が必要であることを示してきた。「HLA に関する知識」にも「HLA そのものに関する知識」と「使用試薬や解析ソフトに関する知識」があり、今回の Sanger 法と新規アレルの結果からは知識の重要性を十分に感じる回となった。

新規アレルは、いずれの方法いずれの施設でも遭遇する可能性がある。その時に専門の技術者としてどのように考えて対応できるかを意識する機会になったと思われる。また、ambiguity には新規アレルの可能性も含むことを念頭に置くことも重要であると考えられる。

第 21 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 25 施設で、昨年と比べ 3 施設増加していた。このうち 19 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。また、25 施設中 22 施設は SSP 法単独の参加であった。

2) 使用試薬

低解像度試薬を使用していた施設は 23 施設で、Micro SSP JPN の使用が最も多く 20 施設であった。中～高解像度試薬を使用していた施設は 2 施設で、すべて他法との併用であった。

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) アレル判定
- 3) 結果の表記法
- 4) SSP 法の結果と総合判定の齟齬の有無

詳細な結果データについては、学会公式サイトの第 21 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 3 施設あった。このうち 2 施設で false negative が報告されたウェルは昨年度の QC ワークショップでも false negative が報告されたウェルであり、陽性バンドの判読が難しいウェルであることが示唆された。SSP 法は泳動像を目視で確認するため、各ウェルの陽性バンドの位置や特徴を知ることは正しい判読のために重要と考えられる。また、判定が難しい場合には他の SSP 検査キットや他法によ

る再検査も選択肢として重要であると考えられる。

インターナルコントロールバンドが出現しない反応が検出されたまま判定を行った施設が 1 施設あった。このような場合には誤判定や新規アレルの見逃しにつながるため再検査を実施する必要がある。また、反応データの記載ミスが疑われる施設が 3 施設あった。

2) アレル判定では解析ソフトで Ambiguity として挙がっていたアレルを見逃していた施設が 2 施設あった。解析ソフトでの判定方法の見直しが必要であると考えられる。

3) 欠番や Null アレ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齟齬のある施設が 3 施設あった。記載ミスが原因と考えられる。

4. 新規アレルの検出について

H2904 検体で報告された DQB1 の新規アレルは、今回報告のあった SSP 法の検査キットでは検出されなかった。検査キットは既知アレルに対応した試薬であり、既存のプライマー設定では今回の新規アレルを区別できなかったためである。プライマーの設定部位に変異があり、既知の反応パターンとは異なる結果が得られるような場合には「判定不能」となり新規アレルが疑われると考えられる。

5. まとめ

明らかな反応の不備が 3 施設、アレル判定のミスが 2 施設あり、検査手技や判定方法の見直しの必要があると考えられる。また、判定の難しい反応があった場合には他の SSP 検査キットや他法を利用することも重要であると考えられる。

第 21 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 (LABType) —

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. 概要

1) 参加状況

PCR-reverse sequence specific oligonucleotide (PCR-rSSO) である LABType の参加施設は、10 施設であり部門別内訳は、臓器移植分野 7 施設、造血幹細胞移植分野 4 施設、輸血関連分野 5 施設、その他分野で 1 施設であった。(部門重複含む)

2) 対象ローカス

試薬キットは、LABType SSO 6 施設、LABType HD 4 施設、LABType XR 4 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-DRB3, 4, 5 Locus 1 施設、HLA-C Locus 7 施設、HLA-DQ Locus 5 施設、HLA-DP Locus 4 施設の参加であった。また、H29C は 8 施設の参加があった。

2. 解析および結果

1) 表記法

ambiguity の記載がない施設もあったが、今年度の新たな試みとして使用された試薬のカタログファイルを報告して頂き、日本人に限定した推定 4 桁アレルだけではなく ambiguity も正確な解析が可能になった。

2) 精度管理

各施設から提出して頂いた csv ファイルから分析機器の精度管理について確認した結果、Calibration・Verification の有効期限が過ぎている施設を認めた。

3) カウント数および Control Beads

各施設から提出して頂いた CSV ファイルを再解析しカウント数および Control Beads を確認した結果、H29C (陰性コントロール) において反応性を示す施設を認めしたが、この施設では分析機器に取り込むビーズ数を 100

から 50 カウントに設定変更していることを確認した。

4) 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結果、全ての locus で最大 2 箇所まで解析に cut-off 値の変更を要していた。

3. 新規アレルについて

基本的に LABType は、既知のアレルをタイピングするために設計された試薬である。そのため、新規アレルには対応していないが変異ポジションによっては False negative や False positive のプローブが存在し判定不能の場合にのみ新規アレルを疑うケースが存在する。今回の HLA-DQ Locus は、変異箇所にプローブ設定がない新規アレルのケースであった。

4. まとめ

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 まで結果報告している施設もあることから今年度の新たな試みは正確な ambiguity 解析まで可能な有用な報告が出来たと考える。日頃から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。

今年度の詳細な報告結果については、学会公式サイトに掲載されている「第 21 回 QC ワークショップ報告集」を参照して頂きたい。

※ LABType SSO HLA DRB3, 4, 5 の訂正

LABType SSO HLA DRB3, 4, 5 は、Exon2 の DRB3, 4, 5 遺伝子にのみ反応を示す Positive Control であることが判明しました。H2903 の DRB3, 4, 5 は、-/- であることから Positive Control ビーズへの反応が無いことが正し

く、QCWS 集会で「増幅不良」と報告したことを訂正
させていただきます。LABType SSO HLA DRB3, 4, 5 におけ

る増幅不良との鑑別には、DRB1 Locus の結果を必ず併
用確認して頂く必要があります。

第 21 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 (WAKFlow, GenoSearch) —

奥平 裕子¹⁾

¹⁾ ジェノダイブファーマ株式会社

1. 概要

1) 参加状況

全参加施設 77 施設中, Luminex 法での参加施設は 53 施設 (68.8%) 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 38 施設 (Luminex 法参加施設の 71.7%), GenoSearch を使用していた施設が 6 施設 (Luminex 法参加施設の 11.3%) であった。そのうち 1 施設は WAKFlow と GenoSearch の両方を実施していた。また WAKFlow, GenoSearch を使用していた 43 施設のうち, 陰性コントロールのデータは 42 施設において提出されていた (参加施設の 97.7%)。陰性コントロールのデータ提出が任意であった昨年の 58.8% に比べ 38.9% 増加した。

2) 対象ローカス

WAKFlow, GenoSearch で参加していた 43 施設のうち, HLA-A, -B 遺伝子座の解析は全施設で実施されており, 次いで HLA-DRB1 座は 40 施設, HLA-C 座は 39 施設で解析されていた。

2. 解析方法

実験操作, 解析, 報告の 3 項目について以下の様に細分化し, 事例を挙げて注意点を示した。

1) 実験操作

- 陰性コントロールの蛍光値
- 陽性コントロールビーズの反応性
- 各プローブの陽性, 陰性の比

2) 解析

- ミスアサイン
- 判定に迷うケース
- クロスプローブ

3) 報告

- 表記について
- 4) 新規アレルについて

3. 解析結果および考察

1) 実験操作

- 陰性コントロールの蛍光値については, 多くのプローブが誤反応していた施設があり, コンタミが疑われた。原因究明と, 汚染防止のためフィルターチップを使用し, 増幅 DNA を扱うエリアを物理的に分ける等, 対策を行うことが望まれる。
- 陽性コントロールビーズの反応性については, 施設間の反応性を比較出来るよう, 各陽性コントロールビーズの蛍光値の平均とばらつきをグラフ化した。陽性コントロールビーズの蛍光値が低いという事は PCR の増幅不良, ハイブリ効率の低下を意味しており, 陽性コントロール以外のプローブの蛍光値も低下する。その結果, 多くのプローブのカットオフ値変更が必要となり, ミスアサインを招きやすことから, PCR 操作, ハイブリ操作の見直しが必要であることが示唆された。
- 各プローブの陽性, 陰性の比については, プローブの P_{min}/N_{max} (陽性の最小値と陰性の最高値の比) が 50 以上, 10 以上 50 未満, 3 以上 10 未満, 3 以下に分けてグラフで示した。DRB1 で P_{min}/N_{max} の比が 3 以下であるプローブが他施設より多い施設では, 陽性, 陰性の反応が明瞭でないため, ミスアサインがみられた。このような事例では, ハイブリ, 洗浄操作の見直しが必要であると考えられる。

2) 解析

- ミスアサインについては, クロスプローブが高く反

応したことによりミスアサインしていた施設があり、意図的なカットオフ値変更は誤判定に繋がる事が示された。無理にアサインせず、再検査や他法での判定を行うことが望まれる。

- 判定に迷うケースについては、1プローブの陽性、陰性でタイプが変わる例を挙げ、ミスアサインのケースと同様、無理な判定はしないという判断の重要性を示した。
 - クロスプローブについては、DRB1のD#37TG（クロスプローブ）はH2902検体で35施設中、14施設でカットオフ値の変更（FP）をおこなっており、判定の難しさが示唆された。しかし、21施設については変更せずにタイプ出来ていたことから、施設間差も原因の一つではないかという事が見出された。細部までプロトコルに添った実験操作を行うことで、施設間差が埋められる可能性が考えられる。
- 3) 報告
- 表記については、転記ミスをしていた施設があった。反応データに問題はなくても、誤判定と同様に誤った結果となってしまうため、ダブルチェックを行う

などの対策が望まれる。

4) 新規アレル（2904検体DQB1*06:01:01の新規）については、Luminex法（WAKFlow）では、検出されていなかった。検出されなかった理由として、置換部位と、プローブ設定位置の関係が考えられる。置換部位にプローブが設定されていなかったため、検出できていなかった。しかし、プローブ設定位置に置換がある新規アレルの場合には、既知の反応パターンと一致せず「判定不能」となることがあると考えられる。（GenoSearchは、DQB1のキット販売はない。）

4. まとめ

今年度から配布された陰性コントロールで、プローブの誤反応が見られた施設があった。これは、実験そのものの信憑性に関わる重大な事態である。また、プローブの陽性、陰性の差が明瞭でないと、ミスアサインに繋がる。実験環境や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。さらに、解析で迷った際は無理にアサインせず、再検査や他法による検査を考える必要がある。

第 21 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—

小島 裕人¹⁾

¹⁾ 公益財団法人 HLA 研究所

1. 概要

1) NGS 法

参加施設は、2 施設であった。使用キットは 2 施設で異なり、それぞれ ScisGo HLA, NXType NGS HLA であった。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、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。

2) Sanger 法

参加施設は、6 施設であった。使用キットは SeCore を用いた施設が 4 施設であり、他の 2 施設は Allele SEQR であった。判定ソフトは、SeCore を用いた 4 施設が uTYPE, AlleleSEQR を用いた 2 施設はそれぞれ、Assign, SBTengine であった。

対象領域については、Class I は 1 施設のみ A, B 座が exon 2 ~ 4, C 座が exon 2 ~ 6 であり、その他の 5 施設は A 座, B 座, C 座ともに exon 2 ~ 4 であった。Class II のうち、DRB1 座は 2 施設が exon 2 のみ, 4 施設が exon 2, 3 と相違があった。

2. 結果および考察

1) NGS 法

2 施設で使用キットが異なり、伴って対象領域が異なるために結果の評価はできなかった。

2) Sanger 法

① 要改善項目

- Ambiguity の見落とし

H2901 の A 座, H2903 の C 座でそれぞれ 2 施設, 1 施設が Ambiguity となる候補アレルが抜けていた。ダブル

ルチェックなどの方法によって、判定結果を確認することが必要である。

- 塩基配列の挿入 / 欠失多型の判定

2 施設について、塩基配列の挿入 / 欠失多型が Ambiguity となる候補から除外されていなかった。両施設が共に使用していた判定ソフトである uTYPE では、塩基配列の挿入 / 欠失多型が結果の MM 欄に「0*」が表示され、ダブルクリックで除外の操作をすることができる。

- DRB1 座 codon 86 の Ambiguity

2 施設について、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 が解消できていなかった。両施設が共に使用していた判定ソフトである uTYPE では、Sample 欄の「Filter」ボタンを押すことで結果に反映することができる。

② 要確認項目

- 最新アレル抜け

H2901 の DRB1 座で、Ambiguity となる候補アレルに DRB1*15:140 を含んでいない施設があった。DRB1*15:140 は、2017/1/20 に IMGT に登録されたアレルであり、参照配列を古いバージョンで使用している施設では、近々で登録されたアレルが Ambiguity に含まれていなかった。

3. 新規アレルについて

H2904 の DQB1 座は、NGS 法で検査を実施した 2 施設で新規アレルと判定され、DQB1*06:01 の codon 133 (exon 3) が CGG から TGG に置き換わっていた。Sanger 法では、反応パターンから DQB1*05:09, *06:56 の組み合わせが判定され、新規アレルを見逃す可能性がある。

今回、Sanger 法を実施した 5 施設のうち 3 施設は、DQB1*06:01 もしくは新規アレルの可能性を判定してお

り、DQB1*05:09 および DQB1*06:56 が日本人にまれなアレルであることを加味していた。判定された結果がまれなアレルである場合は、再検査や他法での確認が必要である。

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。

Sanger 法は、各施設において検査結果を得るまでの技術的な問題点は無く、施設間の結果の違いは、判定時のミスがほとんどであった。新規アレル判定の例にみられるように、判定者の HLA に対する知識レベルの向上は、ミスタイプを減らす一つの方法である。また、塩基配列の挿入/欠失多型や DRB1 座の codon 86 の判定については、ソフトウェアの使用法とともに、HLA の特徴を知っておくとよい。

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート —試料説明 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

サンプルは、学会から日本赤十字社への譲渡依頼に基づいて保管している抗血清の中から、目的に応じた4種類を複数名で検討し選択した。選んだ抗血清は、トロンビン処理、防腐剤（チッ化ソーダ）および着色料の添加、フィルターによる清浄化を実施し参加施設に配布している。ちなみに、従来からの抗体 QC のサンプルの要件としては、①日本人に通常検出される抗体であること、②一部の試料では、HLA-C 座抗原に対する抗体、IgM 性抗体、HLA 以外の非特異反応が含まれる場合などがあげられる。今年度は、クラス I 抗体で IgG と IgM で異なる特異性を保有するもの（SH2901）、DQ1 および DPA1 の特異性を保有するもの（SH2902）、DQ234 の明確な特異性を保有するもの（SH2903）、C、DR ローカスの明確な特異性を保有するもの（SH2904）を選定した。

一方、クロスマッチについては、ダイレクトクロスマッ

チ対象のサンプル（SH2901）は、特異性が限局されていること、各施設でのパネルの準備が比較的容易であること、抗体検査結果とクロスマッチの測定結果の違いに興味深い点があることが選定理由であった。また、仮想クロスマッチ対象のサンプル（SH2904）は、クラス I 抗体について、C ローカス抗体の検出がクロスマッチの結果に影響すること、クラス II では DRB345 に対する考え方、などが再確認できる組合せを選定した。

このように抗体 QC のサンプルは、限られた選択肢の中から、参加施設の精度管理や抗体検査の基礎知識の復習、さらには現状に応じた問題提起の材料となることを期待して選定している。参加施設はそのことを意識して検査に取り組み、学会公式サイト掲載の方法別解析結果および、事務局から送付される全解析データ（CD）に目を通して、日常検査の水準維持に役立てて頂きたい。

第 21 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

1. 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 31 施設、臓器移植部門 36 施設、造血細胞移植部門 24 施設 (重複あり) の 57 施設 (初参加は 2 施設) であった。施設別では、病院・大学に属する施設が 70% 以上を占めていて、検査・血液センターおよびそれ以外の施設の参加率を大きく上回っていた。また部門別の参加構成を調査したところ、複数部門への参加は 25 施設 (全部門 11, いずれか 2 部門 14) 単独部門への参加は 29 施設 (輸血 10, 臓器 19, 造血部門 0) と、割合としては同程度であった。

2) 抗体検出およ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 (4 サンプルのクラス I & クラス II) において 98.2% の一致率であった。今回は 4 サンプル中の 1 本 (SH2904) が高バックグラウンドを示すサンプルであり、その処理が功を奏さず判定保留となった施設が 1 箇所あった。このサンプルの検体処理の効果には施設間差を認めたが、その原因を究明するには至らなかった。今後の QCWS でも高バックグラウンド検体への対処法については継続的に調査する予定である。

抗体特異性同定検査については、検査を実施した 43 施設中、42 施設が 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おり、スクリーニングと特異性同定を段階的に実施する施設は 33 施設 (76.7%) と例年同様に検査の目的を意識した進め方を実践する施設が大半を占めていた。

2. 結果評価

1) 評価結果の比較について

日本人 HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の HLA 抗原について、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公式サイトに掲載)。その結果、参加施設 57 施設のうち抗体検出については A 評価が 98.2% で、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 36 施設 (83.7%), 評価 B が 7 施設 (16.3%) であり評価 C は無かった。

今年度は全体的に昨年を下回る結果であったが、総合判定の結果報告シートを大幅に改訂したことによる理解不足も一因であると考えられるため、次年度に向けて改良する予定である。

2) 総合判定結果比較について

各施設が提出した総合判定結果を集計し、サンプル毎にその一致度を確認した。その結果、SH2901 のクラス I 抗体は IgG と IgM で特異性が異なっていた為、Ig クラス別に検査を実施した施設としなかった施設での判定結果に齟齬があった。IgM 性抗体検出の必要性は、検査目的に依存すると思うが、43 施設中、4 施設 (9.3%) の参加では比較検討することも難しく、データ収集をすすめるに留まるのが現状である。また、SH2902 および SH2903 については、特徴的な点は認めなかったが、反応性が比較的弱い特異性が含まれていた SH2904 の一致率が低い傾向にあった。

次に、判定結果の施設別一致率を比較すると、4 サンプルの平均値が 70% 以下となる施設はクラス I 抗体では 4 施設、クラス II 抗体では 6 施設であった。このうち 3 施設はクラス I と II で重なっており、その原因は特

異性同定検査には適さない試薬の使用や、判定の考え方に他施設との乖離があるためと推測された。

3) 総合判定結果不一致の原因について

Score の一致率がクラス I 抗体では 90% 以下、クラス II 抗体では 85% 以下の場合について、各施設が提出した検査方法ごとの測定結果と総合判定結果（アレル別判定含む）から不一致となる要因について推測すると、以下の 4 点に纏められた。

- 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 用いる試薬に含まれる抗原（アレル）ピーズの種類に依存する場合。
- ③ 特定の施設の反応性が他施設と大きく異なる場合。

- ④ 抗原ピーズのアレルによって反応が異なる場合。

3. まとめ

今回のサンプルでは、明確な HLA 特異性は全施設で概ね検出できていたが、試薬の性能に影響される特異性（HLA-C, HLA-DQ, HLA-DP）や、LSSA Supplement などの抗原ピーズ追加に起因する最終判定の施設間差を認めた。これらの現象は、抗体 QC の最近の特徴である。参加する施設が使用する試薬の種類（解像度）や陽性カットオフ値が概ね同等の反応帯に入っていることを前提に考えると、蛍光シグナルのみに依存する判定ではなく、抗体のエピトープを意識した判定方法やその考え方を参加施設に対して啓蒙して行く必要があると考える。

第 21 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 を使用した施設は、スクリーニングで Class I が 18 施設、Class II が 17 施設であった。シングルアンチゲンの参加施設はなかった。参加施設数は、年々減少傾向である。

2. 測定機器と試薬ロット

測定機器、および試薬ロットの詳細は学会公式サイトの解析資料を参照して頂きたい。

3. 解析方法

各施設からヒストグラム、および RAW データを提出頂き、解析ソフト Flow Jo, Kaluza を用いて再解析を行い、取り込みビーズ数、%PRA などを確認した。

4. 解析結果

判定スコアの一致率は Class I, II ともに 100% と良好

だった。しかし、数施設においてはビーズの取り込み数が少なく、十分なカウント数に達しておらず、昨年度との連結比較を行っても改善が認められない点も見受けられた。

%PRA に関しては、マーカー設定が依然各施設により異なっているため、数値は取束していない。取り込み数も同様に、昨年度との連結比較を行ってみたが、改善が認められない施設も見受けられた。詳細は、学会公式サイトを参照して頂きたい。

5. まとめ

FlowPRA 試薬を用いた検査の判定スコアの一致率は、100% と良好な結果であり、問題は認めなかった。今回、取り込みビーズ数や %PRA を昨年度のデータとの連結比較を行うことで、改善ができていくか否かを確認した。メーカーが推奨している取り込みビーズ数や、メーカーの設定を再度学会公式サイトで確認し、参考にしていきたい。

第21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 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

QCWS 抗体部門参加の 57 施設において WAKFlow MR (以下 MR) の参加施設は Class I が 15 施設 (26.3%), Class II が 8 施設 (14.0%) であり, どちらも昨年より 1 施設減少していた。WAKFlow HR (以下 HR) の参加施設は 12 施設 (21.1%) であり, 昨年より 1 施設増加していた。なお, 解析結果の詳細は学会公式サイトの第 21 回 QC ワークショップ報告集をご参照いただきたい。

2. 解析項目, 試薬ロット

1) MR (Class I・Class II)

解析項目は, ①バックグラウンドビーズ (BB) および陽性コントロールビーズ (PB) の施設間差, ②各施設間の Median 値の比較, ③各施設間の Median 値および Index 値の 2SD における比較について行った。試薬ロットは, Class I では全施設同一 (T0B) であり, Class II では 2 種類の試薬ロット (T0A, T0B) が使用されていた。

2) HR (Class I)

解析項目は, ①バックグラウンドビーズ (BB) および陽性コントロールビーズ (PB) の施設間差, ② Median 値および Calmed 値の施設間差, ③サンプルごとの反応性の比較について行った。試薬ロットは, 全施設同一 (T0A) であった。

3. 解析結果

1) MR (Class I・Class II)

SH2901 のバックグラウンドビーズ (BB) において, 非特異反応吸着処理の有無で Median 値に施設間差が見られた。各施設間の Median 値および Index 値の比較では, 2SD から外れるデータも散見されたが, Index 値ではほぼ問題なく, 抗体有無の判定結果に影響することは無

かった。Class II では, 1 施設のみ試薬ロットが異なっていたがロット間差は見られず, Median 値のばらつきが少なく良好な結果であった。血清処理方法や洗浄操作, 装置の状態などによって施設間差はある程度見られるが, 日常的に MR を使用されている施設が多いと思われる, 洗浄や手技的な操作に問題はないと考えられた。

2) HR (Class I)

Median 値および Calmed 値共に高い傾向が認められた施設 (29S44, 29S56) があり, 明らかに他施設と乖離する反応性が認められた。SH2901 の IgM 抗体の特異性とほぼ一致することから, 使用した二次抗体はキット添付品ではなく MR の二次抗体と推測された。精度管理を目的としている QCWS では, キット添付品での実施を推奨する。また, HR と LABScreen Single Antigen (以下 LS-SA) の反応性において, サンプルによる違いもあるが, 弱い反応 (nMFI: 3000 以下, Calmed: 2000 以下) での乖離は生じることが多かった。

4. まとめ

問題点として, MR で血清処理試薬を使用した場合に, 陰性コントロールを適正に使用していない施設があった。QCWS 参考プロトコルや試薬メーカーの使用方法を確認いただくことを推奨する。また, 抗体特異性判定において 2 法の検査を実施した場合, どちらかの結果を優先する施設と, 2 法合わせた結果で総合判定している施設があった (HR を実施した 12 施設中の 8 施設が LS-SA も実施していた)。入力方法やアレル特異性抗体の判定などは今後の課題と考えられる。また, MR・HR 共通の問題点として, 測定データが Sample Empty (ビーズカウント不足) となっていた施設があった。判定結果に影響する可能性があるため, 装置や試薬の状態を確認し, 再検査基準など自主的な管理の実施を推奨する。

第 21 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 ルミネックス (LABScreen) 法—

前島理恵子¹⁾, 蟹井はるか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 57 施設のうち LABScreen を実施した施設は 40 施設 (70%) であった。LABScreen 実施施設のうち、スクリーニングのみ行っている施設は 2 施設であった。Single Antigen (LS-SA) を行っている施設のスクリーニング法の内訳は、Mixed が 9 施設、PRA が 7 施設、Multi が 1 施設、LABScreen 以外が 13 施設であり、そのほとんどが WAK Flow MR を実施していた。LS-SA を実施しているが、スクリーニング法の記載のない施設が 8 施設あった。supplement beads を使用している施設は 24 施設あった。部門別による検査方法に偏りは見られなかった。

2. 結果解析

LS-SA 実施施設が 38 施設と多数であったため、LS-SA のデータについて解析を行った。

1) 抗体の有無

Class I, II 共にすべての検体で陽性と判定しているが、非特異反応が改善しなかった S31 は SH2904 を判定保留としていた。

2) 検体の処理方法

QCWS プロトコルで必須とされている凍結融解および遠心を行っている施設は 10 施設であったが、データシートへの記載漏れが考えられた。NC ビーズ値が高い場合に行う非特異反応吸着処理は 16 施設で行っており、PC ビーズ値が低い場合に行う DTT 処理は 5 施設で行っていた。

3) コントロールビーズの施設間差

再検基準となる NC ビーズ値 500 以上の施設は、SH2903 および SH2904 で多数存在したが、PC ビーズ値

3000 以下の施設は存在しなかった。再検基準を超える施設は多数存在するが、ほとんどの施設で再検に関するコメントがなく、再検基準を超えているのに再検していないのか、非特異反応吸着などの処理を行っているが NC ビーズ値が高いのかが不明であり、データシートへ再検の有無を記載する必要があると感じた。

4) 検体前処理法による PC/NC の比較

SH2903 および SH2904 において、PC/NC 値 10 未満の施設が存在したが、検体前処理法による差は認められなかった。

5) カットオフ値

ほとんどの施設が nMFI ≥ 1000 をカットオフ値としており、これに CREG やエピトープを考慮した判定を行っている施設が多数存在した。S09,41 はカットオフ値の記載がなく、S06,20,33,38,45 はカットオフ値と記載していた。自動判定の Rxn >6 を陽性としていると考えられるが、データシートへの記載は明確にしてもらいたい。

6) nMFI : 1000 を中心とした各ビーズの反応

① Class I

他施設と比較して nMFI が高い施設、低い施設があったが特定の施設に限定されているわけではなかった。SH2901-2904 全ての検体において、nMFI が Average から大きく外れる施設が存在した。SH2903 では nMFI が低値集団と高値集団に分かれるビーズが存在した。SH2904 は全ビーズの 1/3 にバラつきがあり、nMFI が 0-7814 と大きく離れるビーズも存在した。

② Class II

SH2901-2903 では nMFI が大きく離れているビーズは存在しなかったが、SH2904 では Average より低いビーズが複数存在した。

SH2904 は Class I, II ともにピーズの値にバラつきが見られたが、NC ピーズの値が高いことによる非特異反応が考えられた。

3. エピトープ解析

Single Antigen を実施した施設を対象に抗体特異性のエピトープ解析を行った。個別ピーズに対する反応が nMFI>1000 を示す施設の割合が 2/3 以上を Consensus として評価し、nMFI の平均値と比較し、解析した。エピトープの存在する場所 (α ヘリックス, β シート), 認識する

アミノ酸の数と位置 (単一のアミノ酸, 離れた数か所のアミノ酸) などにより, 反応に差が認められた。SH2903 や SH2904 のようにバックグラウンドが高いことにより, nMFI に影響が出る場合, 抗体特異性の判定が難しくなるが, エピトープを考慮すると抗体特異性を見逃さずに判定ができる。Class II では同じピーズに DQA1 と DQB1, DPA1 と DPB1 のアレルが存在するため, エピトープを考慮することでどちらの反応であるか, 推測することができる。

第21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 その他検査法およびクロスマッチ—

藤原 孝記¹⁾²⁾

¹⁾ 帝京大学医療技術学部臨床検査学科 免疫検査学

²⁾ 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

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、昨年と同様に定義し、参加状況を分類した。

その他検査法は、FlowPRA, LABScreen, WAKFlow 以外の抗 HLA 抗体検査において、SH2901～SH2904 の 4 種類を対象としている施設で、LCT 法 (0 施設)、AHG-LCT 法 (1 施設)、MPHA 法 (3 施設)、FCM 法 (0 施設)、ICFA 法 (1 施設) の参加であった。

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、SH2901/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施設で、LCT 法 (6 施設)、AHG-LCT 法 (1 施設)、FCM 法 (7 施設)、ICFA 法 (13 施設) の参加であった。

仮想クロスマッチは、Class I のみ (2 施設)、Class I+Class II (22 施設) の参加であり、昨年より若干の増加であった。

2. 結果解析

1) その他検査法・ダイレクトクロスマッチ

その他検査法を単独で解析することは検査件数が少ないため困難であり、ダイレクトクロスマッチと共に解析した。解析方法は測定値、スコア、判定基準にて解析を行い、LCT・AHG-LCT は総合判定の特異性を基にスコアを解析、MPHA は同一パネルをまとめてスコアを解析、FCM は FCS ファイルを再解析、ICFA は Class I-1 ビーズ、Class I-2 ビーズをそれぞれ解析した。

① 抗体の有無：Class I は、31 施設中 30 施設が、Class II は、全 28 施設において抗体ありと判定した。Class I

を実施した 1 施設が判定保留としていた。

② LCT・AHG-LCT：AHG-LCT では反応しているが、LCT では期待通りの反応を示さない例があり、検出感度の違いによるものか、手技的な問題によるものかは不明であった。また、凍結細胞を用いた AHG-LCT で期待通りの反応を示さない例があった。細胞の状態や、ウサギ補体、反応時間・温度などの点が統一されていないものの、今回の結果は想定していた範囲内であった。

③ MPHA：SH2904 では予測されていた Cw7 に対する反応が陰性であった。また、SH2903 および SH2904 において施設間差が認められたが、使用したロットの違いによるものか、手技的な問題によるものかは不明であった。本来、血小板特異抗原に対する抗体を検出する方法であり、HLA 特異抗体の検出や同定に用いることは難しい。

④ FCM：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かった。測定細胞数が不十分な例があったが、今回の結果としては問題なかった。測定細胞数が不足するとサンプルに偏りが生じやすく、特にカットオフに近いヒストグラムにおいて測定結果が不正確になる可能性があることから 10,000 個以上、測定することを推奨する。

⑤ ICFA：バックグラウンドの高いケースもなく、概ね期待通りの結果が得られていた。操作手順および判定基準が統一されているため、結果の整合性は高いといえるが、SH2904 では予測されていた Cw7 に対する反応が弱いものも認められた。原因として、抗原側の検体

に血小板が含まれている影響が示唆された。

- ⑥まとめ：LABSceen Single Antigen（以下、LS-SA）の結果から反応が予想される抗体特異性と、各検査方法の結果との乖離をどの様に解釈すべきかが問題点としてあげられる。LS-SA の nMFI が比較的高い場合でもインタクト細胞との反応が認められない場合があり、単に検出感度が低いために反応しなかったのか、インタクト細胞との反応が認められない臨床的意義の低い抗体なのかを判断することは難しい。

2) 仮想クロスマッチ

仮想クロスマッチは、抗体試料（SH2904：移植患者）と DNA 試料（H2902：ドナー）を指定した。抗体試料および DNA 試料の詳細な検査データは、学会公式サイトを参照していただきたい。

- ①仮想クロスマッチ結果：24 施設すべてが仮想クロスマッチ陽性と判定した。
- ②反応が予想される特異性：DNA 試料の HLA タイプ、抗体検査部門の総合判定および LS-SA の平均 nMFI からクロスマッチ陽性となる抗体特異性を解析した。C*07:02（平均 nMFI：18,399）、DRB1*13:02（平均 nMFI：14,379）、DRB3*03:01（平均 nMFI：14,620）

との反応が予想された。Class I+Class II を実施した 22 施設中 9 施設において反応が予想される特異性を Cw7, DR13, (DR52) と報告していた。また、B*39:02 との反応は、平均 nMFI が 1,644 で B3902, Cw7, DR13, (DR52) と報告した施設が 4 施設、B39, Cw7, DR13, (DR52) と報告した施設は 1 施設であった。抗体検査部門の総合判定において、B39 の陽性判定一致率は 81.3% であったが、B3902 に対する反応は、LS-SA で nMFI が 1,000 以下も多く、極めて弱い反応であった。B3902 は、DSA になりうる抗原ではあるが、仮想クロスマッチでは判定保留とし、インタクトセルを用いた方法で確認することが望ましいと考える。

ドナーの DRB3/4/5 タイピングが未実施の場合、DRB 遺伝子領域の構造を考慮しないと、ドナーの DRB1 に対する抗体が陰性であっても、DRB3/4/5 に対する抗体が陽性になることがあり、仮想クロスマッチで見逃す恐れがある。昨年の解析結果を踏まえ、ドナーの DRB3/4/5 タイピングが未実施で DR52 に対する反応を予測した施設が 8 施設あった。

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート —日本移植学会連携 全血クロスマッチ—

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／事務部医療連携課

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、全血サンプル由来のリンパ球を用いたクロスマッチの精度管理を実施する事となり、今回で 5 回目の実施となった。

2. 経過

今年度は 43 施設の参加があり、参加施設内訳は、臓器移植ネットワークの検査施設が 27 施設、移植関連病院が 9 施設、検査センター 2 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ドナー用の全血の発送は、4 月の QCWS 試料配布の翌週に、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。8 月末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 53 回日本移植学会総会(旭川市)、10 月に開催された第 21 回 QCWS(広島市)にて報告を行った。尚、30 年 2 月に開催される第 51 回日本臨床腎移植学会(神戸市)でも報告予定である。

3. 試料選択および検査方法

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 SH2904 を選択した。SH2904 の DR12 抗体(DRB1*12:01)MFI=18,078 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。方法別にみると、フローサイトクロスマッチ Flow Cytometry Cross match ; FCXM 法が参加施設の 34 施設(79%)と最も多く、次いでリンパ球細胞傷害試験 Complement dependent cytotoxicity ; CDC 法が 18 施設(47%)、Immunocomplex capture fluorescence analysis ; ICFA 法が 14 施設(35%)であった。

4. 結果

DR ローカスが DSA になるため、B 細胞を材料とした方法の結果は陽性、T 細胞は陰性となった。結果については各方法で高い一致率であったが、FCXM において乖離した施設が目立ち、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た。CDC においては、陽性細胞を顕微鏡下で目視し、カウントする % 死細胞に差を認め、弱陽性サンプルの判定に不安が残る。詳細な各方法の一致率は、学会公式サイトを参照して頂きたい。

5. まとめ

これまでの 5 回の開催は、各施設が日常使用しているプロトコルでの参加であり、ある程度の結果の一致率は達成しているものの、一部の施設においては問題となる判定も散見した。これらを解決する一つのツールとして、クロスマッチの参考プロトコルの準備が整い、学会のホームページに公開することとなった。来年度は、この参考プロトコルでの参加を呼びかけて、どの程度収束するか確認する予定である。