

第22回 HLA-QC ワークショップレポート

第22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30年1月に第22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するとともに前回の参加施設代表者にもメールで通知した。今回、参加申し込みのあった81施設を表1に示す。参加内容の詳細はDNA-QC:74施設、抗体QC:61施設、クロスマッチ(日本移植学会連携クロスマッチ含む):55施設である。

DNA-QC および抗体 QC に用いる試料は、第26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選定した。4月9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。この間、新たに立ち上げた「表記法ワーキンググループ」でアレル表記法改定について入念に協議を重ねてきた。新表記法は HLA 標準化委員会での取り扱いとし、学会公式サイトに掲載するとともに今年度から QC ワークショップの判定結果に適用した。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4日に各解析担当者に解析用データを配布した。

各施設から提出された結果の解析は、検査法別解析と臨床部門別の総合解析を行った。臨床部門(輸血、臓器

移植、造血幹細胞移植、その他(研究等))の分類は、参加申込書の記載に従った。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ディスカッションを行った。平成30年8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。同時にデータ集と解析結果を CD-R で配布した。集会では、アンケート調査を実施し111名の参加者から回答を得た。大会終了後、各解析担当者は解析結果のレポートを作成し本学会誌(MHC)へ掲載した。

2. QCWS のテーマおよび試料選定について

試料は、検査法リーダーである副部会長と試料担当者と協議して、テーマに沿って選定した。

DNA-QC のテーマは、① DNA タイピングが適正な操作過程に基づき正確に行えること、② 表記法に従いタイピング結果の表記を正しく記述できること、③ DNA タイピング結果に対応した HLA 抗原型を正確に読替えることの3点とした。DNA 試料は、細胞バンクから購入済の細胞について使用歴が無いもしくは少ない細胞で、レアアレル・HLA 型・ハプロタイプ等を意識できる細

[#] 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⁾、奥平裕子¹⁰⁾、川井信太郎¹¹⁾、吉川枝里¹²⁾、木村彰方⁸⁾、小島裕人¹³⁾、小林孝彰¹⁴⁾、田中秀則¹³⁾、藤井明美¹⁵⁾、藤原孝記¹⁶⁾

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⁾ ジェノダイブファーマ株式会社 ゲノム解析部門 HLA 検査課、¹¹⁾ 湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部、¹²⁾ 東海大学 医学部 血液腫瘍内科、¹³⁾ 公益財団法人 HLA 研究所、¹⁴⁾ 愛知医科大学 医学部 外科学講座、¹⁵⁾ 県立広島病院 臨床研究検査科、¹⁶⁾ 帝京大学 医学部附属病院 輸血部

表 1 第 22 回 HLA-QCWS 参加施設

		(受付順)
1	横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部
2	山形大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部
3	岐阜大学医学部附属病院	検査部
4	亀田総合病院	臨床検査部
5	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
6	富山大学附属病院	検査・輸血細胞治療部
7	東邦大学医療センター大森病院	輸血部
8	九州大学病院	遺伝子・細胞療法部
9	NHO 米子医療センター	臨床検査科
10	NPO法人 腎泌尿器疾患研究所	
11	獨協医科大学病院	臨床検査センター
12	熊本大学医学部附属病院	中央検査部
13	社会医療法人 北橋会 札幌北橋病院	臨床検査科
14	独立行政法人 国立病院機構 岡山医療センター	臨床検査科
15	株式会社ビー・エム・エル	第三検査部 ゲノム検査課
16	佐賀大学医学部附属病院	輸血部
17	日本赤十字社九州ブロック血液センター	検査二課
18	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部
19	大分県立病院	輸血部
20	大分大学医学部附属病院	輸血部
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	日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所	研究開発部
23	名古屋第二赤十字病院	医療技術部 組織適合検査室
24	独立行政法人地域医療機能推進機構 中京病院	検査部
25	帝京大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター
26	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部
27	東京女子医大	中央検査部移植関連検査室
28	日本赤十字社中四国ブロック血液センター	品質部検査一課
29	北海道大学病院	検査・輸血部
30	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
31	鹿児島大学病院	輸血・細胞治療部
32	株式会社ベリタス	バイオサイエンス本部 技術グループ
33	熊本赤十字病院	検査部
34	三重大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部
35	福岡赤十字病院	移植センター 移植細胞研究課
36	北里大学病院	輸血部
37	山形県立中央病院	輸血部
38	株式会社リプロセス	メディカル部 臨床検査室
39	広島大学病院	診療支援部 遺伝子細胞療法部門
40	秋田大学医学部附属病院	腎疾患先端医療センター
41	香川県立中央病院	中央検査部
42	松江赤十字病院	検査部
43	岡山大学病院	輸血部
44	京都府立医科大学附属病院	輸血・細胞治療部
45	岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部
46	株式会社 LSIメディアエンス	遺伝子解析部 遺伝子検査G
47	市立札幌病院	検査部検体検査課 輸血係
48	静岡県立総合病院	検査部
49	徳島大学病院	輸血・細胞治療部
50	株式会社 医学微生物学研究所	信頼性保証部 品質管理室
51	愛媛県立衛生環境研究所	衛生研究課微生物試験室疫学情報科
52	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部
53	大阪急性期・総合医療センター	移植支援検査センター
54	愛知医科大学医学部	外科学講座・腎移植外科
55	公財) 鹿嶋郷腎研究所弘前病院	HLA検査部
56	宮崎県立宮崎病院	臨床検査科
57	東海大学医学部付属病院	臨床検査技術科輸血室
58	日本赤十字社北海道ブロック血液センター	品質部検査一課二係
59	筑波大学	医学部免疫技術室(消化器外科研究室)
60	長崎大学病院	細胞療法部
61	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部
62	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
63	弘前大学大学院医学研究科	泌尿器科学講座
64	独立行政法人 国立病院機構 千葉東病院	臨床検査科
65	がん感染症センター 都立駒込病院	輸血・細胞治療科
66	金沢医科大学病院	北陸移植HLA検査センター
67	日本赤十字社東北ブロック血液センター	品質部検査一課
68	株式会社エス・エル	品質保証部 精度管理グループ
69	湧水製薬株式会社	試薬・診断薬事業部
70	沖縄県立中部病院	検査科 HLA検査
71	宮崎大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部
72	東京大学医学部附属病院	輸血部
73	関東甲信越ブロック血液センター 東京製造所	検査部検査三課
74	関西医科大学附属病院	輸血・細胞療法部
75	県立広島病院	臨床研究検査部
76	国立循環器病研究センター	臨床検査部 輸血管理室
77	旭川医科大学病院	臨床検査・輸血部
78	札幌医科大学附属病院	検査部 輸血係
79	信州大学医学部附属病院	輸血部
80	公益財団法人HLA研究所	技術部
81	JCHO仙台病院	統括診療部臨床検査科診療部

胞を選定した。4種類の購入細胞を培養した後、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抗体検査が適正な操作過程に基づき正確に行えること、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4種類を選定した。これらは、過去のQCWSで使用歴があり、当時の解析結果に課題を見出した抗血清とした。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

解析は、主に前年度と同一担当者に、それぞれの担当項目を入れ替えて依頼した。解析結果の公表は、QCWS集会以外の報告、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。

集会では、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、検査方法別解析、総合解析の順に報告した。DNA-QCでは、新表記法の問題点とその解説、評価点と操作工程の関係、ソフトウェアの活用、ビーズカウントの問題、コンタミネーションの状況などが報告された。抗体QCでは、総合判定結果不一致であった要因、スクリーニング検査の位置づけ、コントロールの重要性、バックグラウンド処理などが報告された。最後に総合討論として、「公開バーチャルクロスマッチ」を企画し、各臨床部門の参加者を

指名して仮定の抗原・抗体反応の結果をどのように取り扱うかを討論した。各解析分担項目と解析担当者及び所属は、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
 - 福岡赤十字病院 金本 人美
- SSO ルミネックス法①[※]
 - 日本赤十字社中央血液研究所 内田みゆき
- SSO 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
- SBT (Sanger, NGS) 法
 - ジェノダイブファーマ 奥平 裕子

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
 - 大阪府立急性期・総合医療センター 高山 智美
- 抗体ルミネックス法①[#]
 - 東京女子医大 石塚 敏
- 抗体ルミネックス法②[#]
 - 帝京大学医学部附属病院 前島理恵子

- 抗体ルミネックス法③[#]
 - 東海大学医学部付属病院 小山 暁史
- 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 LABScreen, ② WAKFlow, ③ LIFECODES

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。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た。Ambiguityを可能な限り回避するため、日本赤十字社中央血液研究所でクローニングした1本鎖DNAのHLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 アレルについて、IMGT/HLA 3.32.0 (2018-04)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

表2 第22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	
H3001	A*11:01:01:01 A11	A*31:01:02:01 A31	B*40:02:01 B61	B*40:06:01:01 B61	C*03:04:01:02 Cw10	C*08:01:01:01 Cw8
H3002	A*02:01:01:01 A2	A*02:06:01:01 A2	B*27:04:01 B27	B*67:01:02 B67	C*07:02:01:01 Cw7	C*15:02:01:01 Cw15 [※]
H3003	A*24:02:01:01 A24	A*33:03:01 A33	B*44:03:01:10 B44	B*51:02:01 B5102	C*14:03 Cw14 [※]	C*15:02:01:01 Cw15 [※]
H3004	A*02:06:01:01 A2	A*03:01:01:01 A3	B*35:01:01 B35	B*44:02:01:01 B44	C*03:03:01:01 Cw9	C*05:01:01:02 Cw5
HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
H3001	DRB1*04:05:01 DRB4*01:03:01 DR4 DR53	DRB1*04:10:01 - DR4 -	DQA1*03:03:01:02 DQB1*04:01:01 DQ4	DQA1*03:03:01:03 DQB1*04:02:01 DQ4	DPA1*01:03:01:01 DPB1*02:01:02 DPw2	DPA1*01:03:01:05 DPB1*04:02:01 DPw4
H3002	DRB1*04:05:01 DRB4*01:03:01 DR4 DR53	DRB1*09:01:02 DRB4*01:03:02 DR9 DR53	DQA1*03:02:01:01 DQB1*03:03:02 DQ9	DQA1*03:03:01:03 DQB1*04:01:01 DQ4	DPA1*01:03:01:03 DPB1*03:01:01 DPw3	DPA1*02:08 DPB1*09:01:01 DPw9 [※]
H3003	DRB1*09:01:02 DRB3*03:01:01 DR9 DR52	DRB1*13:02:01 DRB4*01:03:02 DR13 DR53	DQA1*01:02:01:08 DQB1*03:03:02 DQ9	DQA1*03:02:01:01 DQB1*06:04:01 DQ6	DPA1*01:03:01:01 DPB1*02:01:02 DPw2	- DPB1*04:01:01 DPw4
H3004	DRB1*13:01:01 DRB3*01:01:02 DR13 DR52	DRB1*15:01:01 DRB5*01:01:01 DR15 DR51	DQA1*01:02:01 DQB1*06:02:01 DQ6	DQA1*01:03:01 DQB1*06:03:01 DQ6	DPA1*02:02:02 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

第 22 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. 22ndDNA-QC 細胞選定時のポイント

今回の選定ポイントは以下の 3 点である。①低頻度アレル：日常遭遇する可能性があるレベルの「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。H3003 と H3004 で B44 を含が、A*33:03-C*14:03-B*44:03-DRB1*13:02 は日本人集団で第 2 位、

A*03:01-C*05:01-B*44:02-DRB1*13:01 は 48 位で、どちらも高い連鎖不平衡によりハプロタイプを形成しているため、判定後のハプロタイプチェックに有用である。③HLA 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 法用として配布し、21stQCWS から測定データの提出を必須としている。陰性コントロールが反応している場合には、コンタミネーションによる誤判定に繋がるため、検査環境や技術の見直しを行う必要がある。

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。

第 22 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 参加施設はこれまで増加傾向にあったが、今年も昨年と同じ 74 施設の参加であった。部門別の参加施設数は、輸血部門 40 施設 (54.1%)、臓器部門 51 施設 (68.9%)、造血部門 34 施設 (45.9%) およびその他 6 施設 (8.1%) で、臓器部門で増加傾向にある。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。

方法別参加状況では、SSO (Luminex) が全体の 74.3% を占める 55 施設で使用されていた。

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、59.86 点と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

学会の規定する表記法は 2017 年に改定されたため、今回の QCWS は新表記法「HLA タイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則 (2017 年度版)」に基づき記入する初めての年となった。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。旧表記法で結果を提出した施設が 2 施設あったが、全施設の評価平均点は、39.13 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 99.0 点と良好であった。

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。B 評価がのべ 11 施設、C 評価が 1 施設あった。BC 評価 13 施設のうち Luminex (SSO) が 11 施設と多く、結果に間違いは無かったが結果に影響を与える可能性が高い反応が見られていた。

3. 推定アレルと ambiguity について

H3003 において稀なアレル DPA1*02:08 が検出された。しかし、SSO では ambiguity に推定アレルの DPA1*02:01 が含まれていたため、記入する結果は DPA1*02:01 となった。回答が簡潔になった新表記法では ambiguity が存在するという認識が必要である。

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、2 施設に誤りがあった。ポイント②のハプロタイプについては、確認により判定ミスや転記ミスを回避できた可能性があった。ポイント③の HLA 型への読替えでは、B5102 の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かった。

2) 報告結果から見た課題

今回の正解率は高かったが、工程に課題が見えた。特に SSO では反応性を無視したカットオフ変更が行われており、技術者としての意識改革が必要であると思われる。無理に判定していた施設では、そのような判定が日

常的に行われているのであれば誤判定をしている可能性や稀なアレル・新規アレルを見逃している可能性がある。また、タイピングでは、結果を推測し判定するのではな

く、反応データから客観的に判定されることが重要である。

第 22 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—

金本 人美¹⁾

¹⁾ 福岡赤十字病院 移植センター 移植細胞研究課

1. 概要

参加状況

参加施設数は 34 施設で、その内訳は臓器部門 19 施設、輸血部門 7 施設、造血部門 7 施設、その他 1 施設と多くの施設で使用されている状況であった。

2. 試薬キットおよびロット

各施設が使用した試薬キットおよびロットは、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

解析は、各施設が提出した反応パターン、表記などを基に解析を行った。

4. 解析結果および考察

- 1) SSP 法の反応パターンは概ね良好であった。但し、結果シートへの入力ミスが数カ所認められた。この点に関しては、解析ソフトからのコピー機能で問題は解消されると考えるので、活用して頂きたい。
- 2) 反応の不備 (false positive) による判定ミスが 1 施設

認められた。ミスアサインの原因となっているため検査手技、反応パターンの見直し等を再度お願いしたい。

- 3) 表記は、「HLA タイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則 (2017 年版)」が変更となり、混乱を生じている状況だった。学会の原則に準じて、学会公式サイトの解析資料に適正な表記方法を記載しているので参考にして頂きたい。
- 4) 解析ソフト Fusion の設定がきちんと出来ていないことが原因で、検出したアレルに齟齬を認めた施設があった。設定の確認が必要と考える。

5. まとめ

SSP 法では、反応の不備、解析ソフトの設定不備が 1 施設ずつみられたが、概ね良好な結果であった。但し、今年度は表記法で混乱を生じていた部分も見受けられた。

解析ソフトでは、2018 年度版に対応したアレルだけを出力するようにフィルターをかけているため、あたかも結果が見なし 4 桁になることもあるが、実際は多くのアレルがありアンビギュイティが存在する試薬であるということを理解したうえで試薬を使用して頂きたい。

第 22 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) —

内田みゆき¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

1. 概要

LABType の参加施設は、全 74 施設中 12 施設 (16.2%) であった。

HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 には、LABType SSO, LABType HD, LABType XR の 3 種類のキットがあり、それぞれ 3 施設、4 施設、5 施設が使用していた。LABType HD を使用していた施設はすべて HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 を実施していたが、LABType XR を使用していた施設のうち、HLA-C を実施していたのは 2 施設であった。LABType SSO を使用していた施設のうち HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 のすべてを実施していたのは 1 施設のみであった。

HLA-DQ, HLA-DP は、4 施設が、HLA-DRB345 は 1 施設が実施していた。

陰性コントロールは、12 施設中 9 施設で実施していた。そのうち 1 施設では、H3001-H3004 とは別バッチで測定していた。

2. 解析方法

以下の 5 項目について解析を行った。

- ビーズカウント
- 陽性ビーズの平均値とばらつき
- 各施設の Pmin/Nmax 値の比率
- 陰性コントロール
- カットオフの変更状況

詳細は、学会公式サイトの第 22 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) ビーズカウントエラー

いくつかの施設でビーズカウントエラーが見られた。ビーズ試薬の分注または洗浄操作に問題があったと考えられる。適切な量の試薬が使われているか、技術的な問題はないかの見直しが必要である。

2) 陰性コントロールのコンタミネーション

いくつかの施設でコンタミネーションと思われる反応があった。検査環境や検査技術を見直す必要がある。

3) 再解析結果と判定結果の乖離

①同一バッチ内全てのサンプルが判定不能であった例 (LABType SSO HLA-B)

再解析により、サンプル H3001-H3004 が判定不能になった施設があった。この施設の判定結果に合わせるためには無理なカットオフ変更が必要であり、測定そのものの信頼性が低いと考えられた。

② PCR 不良が疑われた例 (LABType SSO HLA-DQ)

本来なら陰性とするべき低い蛍光値のビーズを陽性として判定していた施設があった。この施設はサンプル H3001-H3004 で蛍光値が低めの傾向にあり、PCR 不良が疑われた。

③自動判定と異なる判定をしていた例 (LABType SSO HLA-C)

自動判定で得られた結果から、1つのビーズのカットオフを変更して判定していた施設があった。変更前後のアレルの遺伝子頻度に差がないことから、ハプロタイプを参考にしたことが推測された。

上記の①、②、③では、いずれも通常では考えられないカットオフ変更をしていることから、他方法を参考にしたことが推測された。複数の検査法を併用して総合的

に判定することは必要なことであるが、検査結果に乖離が見られたときは、どちらかの方法に無理やり合わせるのではなく、再検査した上で判定することが望ましい。

4. まとめ

次のような場合は再検査を推奨する。

- 同一検体内でカットオフを大きく上げ下げしないと判定できないとき
- 同一検査内で複数の検体のカットオフ変更が必要なとき
- ビーズ1つのカットオフ変更で判定結果が変わってしまうとき

第 22 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) —

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. 概要

1) 参加状況

全参加施設 74 施設中, SSO (Luminex) 法での参加施設は 55 施設 (74.3%) であった。このうち試薬キットの WAKFlow を使用していた施設が 41 施設で昨年より 3 施設増加しており, GenoSearch を使用していた施設が 5 施設で昨年より 1 施設減少していた。

WAKFlow と GenoSearch の両方を実施した施設は無かったが, SSO 法の他の試薬キットまたは SBT 法を併用していた施設は WAKFlow が 5 施設, GenoSearch が 2 施設であった。昨年よりデータ提出が必須となっている陰性コントロールについては, WAKFlow および GenoSearch を使用していた 46 施設のうち 1 施設のみデータ提出が無かった。

2) 対象ローカス

WAKFlow を使用した 41 施設では, HLA-A および HLA-B は全施設で実施されており, 次いで HLA-DRB1 が 38 施設, HLA-C が 36 施設, HLA-DQB1 が 23 施設, HLA-DPB1 が 12 施設で実施されており 1 施設のみ HLA-DQA1 も実施されていた。

GenoSearch を使用した 5 施設では, 全施設で HLA-A, -B, -C, -DRB1 が実施されていた。また, どちらの試薬キットもロット間差は見られなかった。

2. 解析項目

以下の項目について解析を行った。

- 1) 陰性コントロールの蛍光値 (平均とばらつき)
- 2) 陽性コントロールピーズの蛍光値 (平均とばらつき)
- 3) ピーズカウント (平均とばらつき)

4) P/N 比 (陽性の最低値と陰性の最高値の比)

5) D#37TG プローブの反応性 (WAKFlow HLA-DRB1)

詳細は, 学会公式サイトでの第 22 回 QC ワークショップ報告集をご参照いただきたい。

3. 解析結果

1) 陰性コントロールについては, ほとんどの施設で問題となるような反応は見られなかったが 1 施設において明らかにコンタミネーションと考えられる反応が見られた。また, この反応は他のサンプルにも影響し, 判定が非常に困難になっていた。日常的にこのような状態はとても危険で判定ミスに繋がる危険性がある。原因調査を行い使用器具や作業環境・手順の見直しなどの検討が望まれる。

2) 陽性コントロールピーズについては, 蛍光値が低くばらつきがあり PCR 不良やハイブリ操作などの影響が疑われる施設があった。そのためカットオフ値を変更しないと判定できないプローブが複数あり, この場合も判定ミスに繋がる危険性がある。無理に判定することはせず, 原因を調査し再検査を実施することを推奨する。

3) ピーズカウントについては, 特定のピーズでのリージョン外れと考えられる現象が複数の施設で見られた。原因は, キャリブレーションの実施間隔が長いことや, 試薬 (ピーズ) の保管状態や使用状況が影響したと考えられる。キャリブレーションの実施で改善される可能性もあるが, 状況を確認し必要に応じてメーカーに確認することを推奨する。

4) P/N 比については, 施設毎に各ローカスの各プローブを算出し集計した。P/N 比が低い場合は, 反応のメリハリが少なく陽性と陰性の差が不明瞭となりカットオフ

値の変更が必要になる可能性がある。実際に多くの施設でカットオフ値を変更して判定していたが判定ミスに繋がる危険性もあるため、必要に応じて再検査を実施することを推奨する。

5) WAKFlow (HLA-DRB1) の D#37TG プローブにおいては、偽陽性反応が出やすく昨年の報告では「細部まで注意を払い、プロトコルに添った実験操作が重要」と注意喚起されていた。今回も同様な反応が複数の施設で見られ、改善された施設もあると思われるが改善されていない施設は検査手順の見直しやメーカー（湧永製薬）に対応を依頼することを推奨する。

4. まとめ

解析結果から、どの解析項目においても判定ミスに繋がる危険性が示唆された。異常反応の無視や、カットオ

フ値の大幅な変更などで無理に判定することは危険であり、原因を調査し再検査を実施することが望ましい。今回、原因不明の異常に対し再検査を実施し再現性もあったため結果を「判定不能」とした施設があったが、正しい判断であったと評価できる。WAKFlowはSSO (Luminex) 法の中で最も使用されていた試薬キットであり年々増加傾向にある。しかしながら、クリアに判定できている施設と反応データに問題が見られる施設との施設間差は大きい。信頼性のある結果を得るためには、適正に管理された条件（機器、試薬、手順等）での工程管理から導き出されることを意識する必要がある。

なお、Genosearchは参加施設が少ないこともあるが、特に問題となる反応などは見られず良好な結果であった。

第 22 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—

奥平 裕子¹⁾

¹⁾ ジェノダイブファーマ株式会社

1. 概要

● Sanger 法

参加施設は 4 施設であり、使用キットは 3 施設が Secore, 1 施設が AlleleSEQR を用いていた。解析ソフトは Secore を使用していた 3 施設はいずれも uType7.1 を、AlleleSEQR を使用していた 1 施設は Assign-SBT v4.7 を用いていた。解析対象領域は Secore を使用していた施設では、Class II については 3 施設ともに DRB1, DQB1 は exon 2, 3 を、DPB1 では exon 2, 3, 4 を対象としていたが、Class I については、A, B は exon 2, 3, 4 を対象とした施設が 2 施設、exon 1, 2, 3, 4, 5 を対象とした施設が 1 施設であり、C は exon 2, 3, 4 を対象とした施設が 2 施設、exon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 を対象とした施設が 1 施設と対象領域はそれぞれ異なっていた。AlleleSEQR を使用していた施設では、Class I については、exon 2, 3, 4 を、DRB1, DPB1 は exon 2 を、DQB1 は exon 2, 3 を対象領域としていた。

● NGS 法

参加施設は 3 施設であり、使用キットは 2 施設が AllType NGS, 他の 1 施設は ScisGo HLA であった。解析ソフトは、AllType NGS を使用していた 2 施設はいずれも TypeStreamVisual を用いており、そのうち 1 施設は NGS engine も併用していた。ScisGo HLA を用いていた施設は Gems-HLA を使用して解析を行っていた。解析対象領域は AllType NGS を使用していた 2 施設では A, B, C, DQA1, DPA1 については Full gene (すべての exon とその間の intron) を対象としており、他の DRB1/3/4/5, DQB1, DPB1 については exon 2 以降 3'UTR までを対象としていた。ScisGo HLA を使用していた施設では DPA1 のみ exon 2, 3, 4 を対象とし、A, B, C, DRB1/3/4/5,

DQB1, DPB1, DQA1 は全ての exon を対象領域としていた。

2. 解析結果

1) 他施設と検査結果が異なる要因

● Sanger 法

Sanger 法における他施設と検査結果が異なる要因としては、推定アレル一覧表に載っていないアレルとの組み合わせから本来表記すべきではないアレルを表記してしまっていた施設があった点と、解析対象範囲が他施設と異なった点の 2 点が挙げられた。

● NGS 法

NGS 法における他施設と結果が異なる要因としては、参照配列のバージョンの問題が挙げられた。旧バージョンでは登録されていないアレルが新バージョンでは登録されており、参照配列の更新の重要性が示された。

2) Quality Value (Quality Scores)

● Sanger 法

Sanger 法を行った 4 施設全てにおいて Q20 以上のクオリティは保たれていたが、他施設に比べて全体的に Quality Value が低値を示す施設もあった。この施設の波形を検証した結果、他施設よりも分離が悪い傾向にあり、原因としてポリマーの劣化が考えられた。

● NGS 法

NGS 法を行った 3 施設全てにおいて概ね Q20 以上のクオリティは保たれていたが、シーケンスの読み終わりにわずかに Q20 を下回る施設があった。

3) Noise/Signal 比

● Sanger 法

Sanger 法を行った 4 施設全てにおいて Noise/Signal 比は 8% を下回っており、全施設ともに良好なシーケンス

データが得られていた。

4) リードデプス, カバー率, アレルバランス

● NGS 法

各施設の平均リードデプスはいずれも 100 を優に超えていた。カバー率も 99% 以上を保っており、解析対象領域を十分な厚みを持つて的確にカバーする良好なデータが得られていた。アレルバランスについては、All-Type NGS キットを使用していた 2 施設ともに、H3001 検体の DQB1 で悪い傾向が見られた。原因は Consensus 配列と参照配列が異なっていたことであった。参照配列が更新され、Consensus 配列と一致する新規アレルが登

録されたことにより解消された。

3. まとめ

Sanger 法, NGS 法ともにデータのクオリティを含めた検査結果は、良好であった。Sanger 法では、Quality Value の確認はデータの精度管理だけでなく、試薬の交換や機器を整備する時期を知るためにも有効である。NGS 法では、参照配列にアライメントするという解析の性質上、参照配列の更新が他法に比べて、より重要であるといえる。

第 22 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

参加施設に配布するサンプルは、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を対象としており、その要件としては、日本人に通常検出される抗体であること、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などがあげられる。今回はそこに『過去の QCWS に使用したサンプルであること』を選択基準に追加し、血清の特性や在庫量などを考慮して担当者で検討し決定した。

具体的には、過去の QCWS 解析で特に問題点があったサンプルで、High Background 検体の処理が適切に実施されたかを確認するもの (SH3001)、各施設での抗体検査とダイレクトクロスマッチの結果の整合性を確認するもの (SH3002)、精製抗原ビーズによる抗体検査の結果から DQ 分子に対する反応性をどう捉えたかを確認するもの (SH3003)、抗 HLA 抗体の検査精度がクロスマッチ結果に影響を及ぼしていたもの (SH3004) を選定した。

なお、配付用の抗血清の処理については、従来の手順

と同様に、防腐剤および着色料の添加、フィルターによる清浄化を実施している。

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サンプル (SH3002) および全血クロスマッチ (移植学会連携) 対象サンプル (SH3004) はそれぞれ、過去の抗体 QC でも同じ目的で配付されており、抗体検査の結果から予測した結果がクロスマッチで十分得られたかを確認することや、クロスマッチにおける検査手技 (判定を含む) の維持向上について確認できるように配慮した。

仮想クロスマッチ対象のサンプル (SH3003) は、昨年同様にクラス II 抗体に焦点をあてたが、今回は特に DQ ローカスのタイピング未実施施設での対応や、タイピング実施施設でも特異性同定結果からの判断などを議論できることを狙いとした。

参加施設においては、全データを収納した配付 CD や学会公式サイトに掲載された解析結果とあわせて再確認されることを願う。

第22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 QC は、輸血部門 34 施設、臓器移植部門 40 施設、造血細胞移植部門 27 施設 (すべての部門で重複あり) の 61 施設と、QCWS で抗体部門を開始して以来、初めて 60 施設を超える参加数となった。また、継続参加の状況については、新規参加 3 施設 (4.9%) に対して 3 年以上の継続参加は 54 施設 (88.5%) であり、多くの施設が継続的に参加している状況を認めた。一方、施設の内訳については、病院・大学に属する施設 (44 施設: 72.1%) がその殆どを占め、国内で HLA 関連検査を実施しているそれ以外の主な施設 (検査・血液センター、メーカーなど) は既に継続参加していることから、今後もこの範疇に入る施設の増加が見込まれる。また部門別の参加構成では、複数部門への参加が 30 施設 (全部門 13, いずれか 2 部門 17) 単独部門への参加が 28 施設 (輸血 10, 臓器 18, 造血部門 0) と、参加の部門が単独か複数部門かという点で同程度の割合となった (この傾向は例年同じ)。

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) 結果の一致率については、3 本のサンプル (SH3002 ~ SH3004) については、クラス I, II ともに 97% 以上と高かったが、SH3001 は、クラス I が 87%, クラス II が 40% と非常に低い結果となった。このサンプルは各施設のバックグラウンド処理の状態を確認する為にセレクトしたものであるが、この点については全施設で問題が無かった。一方、使用試薬の種類によって抗体の検出結果が異なることや、抗体有無を決定する際に同定検査の結果を反映させた施設があったことなどが要因となって判定結果の一致率が低下した

と推測されるが、改めて抗 HLA 抗体検査の基本フローを再考するきっかけとなった。ただし、妥当な評価結果とならないケースが発生するため、評価点算出の対象外とすることになった。

また、抗体特異性同定検査を実施した 47 施設中、45 施設は LABScreen single antigen (41 施設) や WAKFlow HLA 抗体 (HR) (21 施設), LIFECODES (4 施設) など、Luminex で測定する蛍光ビーズ法を用いた同定用試薬で結果判定を行っていたが、2 施設は含まれる HLA 抗原の種類が少ない試薬による判定であったため、結果を保留とする割合が突出して高かった。

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 (ただし、前述のとおり SH3001 は対象外)。その結果、参加施設 61 施設のうち抗体検出については全施設が評価 A で、抗体特異性同定についても、検査を実施した 47 施設中、評価 A が 45 施設 (95.7%), 評価 B および評価 C が各 1 施設 (2.1%) と全体的に評価が低下した昨年と比較して非常に良好な成績であった。これは昨年の反省点から報告シートを改良したことが良い方向に影響したことも一因と考えられる。

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から、抗原別反応値 (各抗原に対するスコア) の一致度を計算し、一致度が 90% 未満であった抗原数を集計した。その結果、対象抗原数 (クラス I で 43 抗原, クラス II で 23 抗原) のうち最も多かったのはクラス I では SH3002 の 11 抗原 (25.6%),

クラス II では SH3004 の 7 抗原 (30.4%) で、これらの原因を大まかにまとめた (以下に記載)。

- ① シングルタイプ試薬 (LABScreen single antigen など) での測定値が 1000 ~ 3000 で、各施設のカットオフ値あるいは特異性判定基準が異なる場合
 - ② 含まれる抗原 (アレル) の種類が異なる試薬を使用していた場合
 - ③ 同一抗原でアレルが異なるビーズの測定値に大差がある場合
 - ④ 記入ミスが示唆される (測定結果と判定結果に整合性が無い) 場合
- ④ については自施設内での改善で解決可能であり、②については各試薬の Lot による変動や参加施設の使用状況なども含めて、解析結果を蓄積する必要がある。

また、①③については、多くの施設が取り入れている MFI 値を指標としたカットオフ値の設定から、Score や Calmed など他の指標値を参考にしつつ、エピトープ解析を考慮した判定にシフトすることで一致度がより高くなる可能性がある。

3) 同一抗原でアレルが異なる精製抗原ビーズの判定について

今年度の改訂で、抗原別反応値から独立した形式でアレル別判定を集計した。

今回は、現状把握を目的とした任意入力であったため、何らかの結果を報告していた施設は、抗体同定検査実施

の 47 施設中 25 ~ 30 施設 (サンプルによって異なる) 程度であったが、過半数以上の施設が結果入力をしたことから、現状に即した結果報告方法について、早急に検討する必要がある。また、アレル判定から抗原別判定に転換する際の考え方には施設間差があり、それらを纏めると以下のようになるが、クラス I, II ともに①の考え方が最も多数であった。

- ① 同一試薬内で 1 種類でも陽性反応があればその抗原を陽性判定とする
- ② 交差抗原の反応を考慮して判定する。
- ③ スクリーニングの結果を参照する
- ④ (DQ 抗体の場合) 分子構造を考慮して判定する

3. まとめ

今回は、過去の抗体 QC で配付したものを対象に選択し、当時と現在の検査レベルや判定に対する考え方の違いを確認することを目的とした。その結果、サンプルのバックグラウンドの適切な処理や判定結果の高い一致率など、検査手技 (工程) においては全体的に維持向上できていることを確認した。しかし、検査試薬の選択範囲の拡大や、多数の測定結果から得られる情報をどのように処理し最終判定結果とするか、またアレル判定から抗原ごとの判定 (その必要性も含めて) についても整理が必要になってきたと考えられる。

第 22 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—

高山 智美¹⁾

¹⁾ 大阪急性期・総合医療センター 移植支援検査センター

1. 参加状況

参加施設は Screening の Class I が 22 施設, Class II が 21 施設で前年度と比べそれぞれ 3 施設増加していた。Single Antigen の参加はなかった。参加部門は臓器移植部門が多い傾向が続いている。

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ご参照いただきたい。

3. 解析方法

ヒストグラム, %PRA, 判定スコアについて解析を行った。

4. 解析結果

1) ビーズのゲート位置のずれやスケールの設定不良により判定に適したヒストグラムが表示できていない施設があった。各施設の測定プロトコルにおける機器設定の見直しが必要と考えられた。

2) Negative Control 血清の位置やマーカーの設定位置, マーカーの再設定の有無といった機器設定や解析方法の違いと, ヒストグラムの右方シフトといった手技的な要因とが重なり %PRA に差が生じていた。

3) 前年度とは異なり, SH3001 と SH3004 で判定スコアの一致率が 100% とはならなかった。試薬ビーズの LOT 間差や膨らみのあるヒストグラムについての判定の施設間差により, 判定スコアの一致率が低下していた。

5. まとめ

FCM 法は Luminex 装置を用いる方法と異なり, 測定時のプロトコルを各施設で設定・調整する必要があり, その機器設定に不備がある場合には結果へ影響する。ヒストグラムの形やカウント数に問題のある施設はまずは機器設定の確認が必要と考えられる。また, 例年と同様に %PRA の数値は収束しておらず, さらに今年度は判定スコアの一致率が低いサンプルもあった。各施設で学会公式サイトの QCWS 参考プロトコルや試薬メーカーのマニュアルをご参照いただき, 機器設定や判定方法について再度確認をお願いしたい。

第22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—

前島理恵子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 61 施設のうち WAKFlow を実施した施設は 26 施設 (42.6%) であり, MR Class I が 15 施設, MR Class II が 8 施設, HR は Class I, II 共に 21 施設であった。HR 実施 21 施設中 17 施設が LABScreen Single Antigen (LS-SA) を実施していた。部門別にみると, 臓器移植 6 施設中全施設が HR のみ実施していた。

2. 解析内容

血清処理によるバックグラウンドビーズと陽性コントロールビーズの施設間差, 各ビーズの反応, 抗体有無の判定結果について解析した。

3. 解析結果

1) WAKFlow MR (Class I Class II)

①バックグラウンドビーズ (BB), 陽性コントロールビーズ (PB) の施設間差

BB では SH3002 に施設によりビーズの反応に差があり, 高値傾向であった。

PB では Median の低い施設はなく, すべての施設で同程度の反応であった。

②各ビーズの反応

ビーズの反応を Median と Index で比較した。Median では 2SD より外れる施設が存在したが, Index では大きな差が出る施設は少なかった。Lot の異なる施設は Index も他施設と値が離れており高値傾向にあった。

③抗体有無の判定結果

抗体の有無について, SH3001 と SH3002 で施設により判定結果が分かれた。SH3001 では Class I は 12/15 施設 (80%), Class II は 2/8 施設 (25%), SH3002 の Class

II では 6/8 施設 (75%) が判定を (8) と判定していたが, ビーズの反応は陰性であった。

2) WAKFlow HR (Class I Class II)

①バックグラウンドビーズ (BB), 陽性コントロールビーズ (PB) の施設間差

BB では SH3002 で高値傾向であり, 施設によりビーズの反応に差が生じていたが, 血清処理試薬使用の有無による施設間差は認めなかった。

PB では SH3001-3004 で施設により反応が異なっていた。

②各ビーズの反応

• Median と Calmed の比較

Class I では 2 種類の Lot, Class II では 3 種類の Lot が使用されており, V0A を使用した S27 が Median および Calmed で 2SD から外れていた。

SH3002 の A24 では, アレルにより Median と Calmed に乖離を認めた。

• Calmed : 1,000 付近の反応

Calmed : 1,000 をカットオフとしている施設が多いことから, この付近のビーズの反応について検証した。ビーズの反応は施設により差があり, 1,000 をカットオフとした際, 陽性と陰性に分かれる反応もあったが, 総合判定に HR の結果を反映させていない施設も多いため, 各ビーズの反応の乖離は判定結果に影響していなかった。

③抗体特異性の解析

• LA-SA の Average との比較

Calmed : 1,000 以上, LS-SA の nMFI : 1,000 以上を陽性として抗体特異性について検証した。Calmed : 5,000 以下のビーズが LS-SA と比較して弱い反応であった。

• エピトープ解析

Median と Calmed に乖離を認めるビーズやアレルによ

り反応が異なるビーズが存在したが、エピトープ解析により弱い反応の抗体特異性を考慮することができると考えられた。

4. まとめ

QCWS 参考プロトコルではBBのMedianが500以上の場合には血清処理試薬を用いて再検査を行うことを推奨しているが、血清処理試薬を使用していない施設が多数存在した。MRおよびHRにて数種類のLotが使用されており、ビーズの反応はLotにより施設間差を生じていた。Medianで2SDを外れる施設も存在したが、IndexやCalmedで補正されるため、抗体有無の判定結果への影響は少なかった。

MRにてビーズの反応が陰性でも判定を(8)として

いる施設があり、MR以外の結果により判定していることが考えられた。スクリーニング試薬として使用するMRの反応が陰性であれば、判定が(1)になるべきであり、他の検査結果を反映させると検査結果と判定が矛盾してしまう。

HRにおいてビーズにより補正值が異なるため、Calmedが陰性化する場合があります、Medianを確認する必要があります。

17施設がHRとLS-SAの両方を実施していたが、総合判定にLS-SAの結果を採用している施設が多数であり、HRの結果が反映されていないため、HRの結果を解析することが困難であった。各検査法による判定結果が解析できるような入力シートにする必要があると思われる。

第 22 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—

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

LABScreen の参加施設は、44 施設であり部門別内訳は、臓器移植分野 27 施設、造血幹細胞移植分野 21 施設、輸血関連分野 24 施設であった。(部門重複含む)

2) 対象試薬

試薬キットは、Mixed 15 施設、Multi 1 施設、PRA 9 施設、Single Antigen 41 施設であった。

2. 解析および結果

1) サンプルの前処理法

サンプルの前処理法は、施設によって異なっており未処理から各種処理法まで様々な状況であった。試薬メーカーが現時点で推奨されているのは、凍結融解、遠心、非特異反応吸着処理、EDTA 添加である。EDTA に関しては、最近になってメーカーが推奨法として採用されたので今後 QCWS の参考プロトコル (処理時の混合比率) も改定されると思われます。

2) Negative Control Serum

メーカー純正の Negative Control Serum を使用していない施設が 5 施設あった。

今回、全施設を同一条件で解析するにあたり HLA Fusion を用いて NBG Ratio・Normalized MFI を算出した。また、Negative Control Serum を使用しなかった 5 施設には default background values (OLINS) を代用した。

全施設における Negative Control Serum は、施設間差が大きく OLINS と比べると全体的にかなり高値を示す施設があった。

Negative Control Serum は、特にメーカーが指定した精度管理上の許容範囲などは設定されていない。そのため、

測定ごとに OLINS と比較して確認をお願いしたい。また、検査の反応工程や手技的な操作 (特に洗浄操作) などによっては OLINS とサンプルがうまく連動して補正されない場合もあるので QCWS ではメーカー純正の Negative Control Serum の測定をお願いしたい。

3) サンプル内の Negative・Positive Control

全施設における QC サンプル内の Negative・Positive Control Bead の値は、施設間差が大きく、再検査基準を超えたデータで報告されている施設があった。

サンプル内の Negative・Positive Control Bead の値には、メーカーが指定した精度管理上の許容範囲・再検査基準が決められているのでメーカー設定ガイドラインおよび QCWS 参考プロトコルを参照して頂きたい。

4) 抗体判定に苦慮した SH3001 の検証

今回、LABScreen Single Antigen Class II において抗体判定に苦慮した DRB1*04:04 や 16:02 は非特異的反応を示すことをワークシートに記載されていた。今後、試薬 Lot 変更時には一度ワークシートの確認をして頂きたい。

3. まとめ

LABScreen Single Antigen の測定結果において、特に臨床ではそれぞれのアレルに対する Normalized MFI を指標とする施設が多いと思われる。

試薬メーカーは、あくまでも同定検査であって経時的に抗体量が確認できる検査法ではないとしているが、メーカー純正の Negative Control Serum 同様にサンプル内の Negative・Positive Control Bead の値を安定させることで、半定量的に抗体推移をみる程度可能になるのではないかとと思われる。

4. HLA Fusion4.2 による epitope 自動解析

HLA Fusion4.2 から HLA Matchmaker の機能が追加された。

HLA Fusion に標準で登録されている epitope は、試薬メーカーが検証したアルゴリズムによるもので HLA

epitope registry (<http://www.epregistry.com.br/>) とは少し異なる。

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 22 回 QC ワークショップ報告集」を参照して頂きたい。

第22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 ルミネックス法 (LIFECODES) —

小山 暁史¹⁾, 杉本 達哉¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部附属病院 臨床検査技術科輸血室

1. はじめに

今回はじめて4施設が LIFECODES LSA Single Antigen (LSA) を使用して抗体部門に参加した。参加施設のうち1施設がスクリーニング測定データを提出したが、参加施設数が少なく比較が困難なために解析対象外とした。LSA 使用施設では他の HLA 抗体検査用試薬を併用していた。LSA は判定方法や洗浄方法に特徴があり詳細は学会公式 HP の第22回 QCWS 報告集をご参照いただきたい。

2. 解析項目, 試薬ロット

参加4施設の試薬ロットはすべて同一であった。LSA では添付文書に2種類のプロトコルが記載されており、プロトコル1 (血清 10 μ L + LSA ビーズ 40 μ L) とプロトコル2 (血清 20 μ L + LSA ビーズ 40 μ L) がある。洗浄方法もフィルタープレートと吸引ポンプの使用を推奨しているが、フリッキング洗浄でも検査可能とされている。今回参加された4施設の実施プロトコルと洗浄方法の組合せは全ての施設で異なっており、同一条件での解析は行えなかった。

解析項目は NC・PC ビーズ及び各ローカスの最低ランク抗原 (LRA) ビーズの施設間差, プロトコル別ビーズの MFI (Raw Value) の差異, LS-SA との反応性比較を行った。

3. 解析結果

1) NC・PC ビーズ及び各ローカスの LRA ビーズの施設間差

NC ビーズ及び各ローカスの LRA ビーズでは、全施設で SH3002 に高値傾向を認めていた。高値傾向を認め

た原因は不明であった。PC ビーズでは大きな乖離は認められなかった。

2) プロトコル別ビーズの MFI の差異

施設により洗浄方法や血清処理方法が異なっていたが、Class I, Class II に共通して認められる傾向として、MFI はプロトコル1 (血清 10 μ L) よりもプロトコル2 (血清 20 μ L) の方が高値傾向であった。Class 1 (SH3003) 及び Class II (SH3003, SH3004) では、プロトコル1の実施設において、MFI 低値傾向を認めた。その影響によりカットオフ MFI 750 付近でプロトコル1とプロトコル2の実施設間で判定結果に乖離を示すビーズが散見された。

3) LS-SA との反応性比較

LS-SA の nMFI 1,000 以上を陽性とした場合、nMFI 1,000 ~ 3,000 では SH3003 においてプロトコル1実施設で判定結果が乖離するビーズが散見された。また、LRA ビーズが高値を示した SH3002 では MFI/LRA 値が低値となり、LS-SA 判定と結果に乖離を認めるビーズを認めた。

4. まとめ

全体的な MFI の傾向としてプロトコル2 (血清 20 μ L) はプロトコル1 (血清 10 μ L) より高値を示していた。血清量の増量により MFI 値が高値傾向を示すことが考えられた。

参考情報として、ヨーロッパではプロトコル1が主流であり、アメリカではプロトコル2が主流である。(FDA にはプロトコル2で申請中) 将来的にはプロトコル2に統一予定とされている。

LSA ではフィルタープレートの使用を推奨しており、今後、参加施設数を増やし洗浄方法の違いによる影響を

解析することが必要だと思われた。

SH3002 のような NC ビーズが高値を示す検体では、LRA ビーズも高値となり判定に影響をあたえる。メー

カーによる高 LRA 値の再検基準は存在しておらず、今後適切な血清処理方法や高 LRA 値に対する再検基準が課題であると思われた。

第22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, LIFECODES 以外の HLA 抗体検査において、SH3001～SH3004 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、SH3002/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 (4施設)、AHGLCT法 (0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 (25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 LCT・AHG-LCT: SH3002 で A24 に対する反応が施設、使用した細胞の状態、方法によって異なっていた。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。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、結果は想定していた範囲内であった。

② MPHA: 検出できなかった抗体も多数ある上、SH3002 ではクロロキン処理後も A2 に対する抗体が検出されているなど、HLA 特異抗体の検出や同定に用いることは難しい。

③ FCM: 測定細胞数が不十分な例があった。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。

④ ICFA: 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。SH3004 で A24 に対する反応が 1 パネル陰性であった。このパネルが陰性になった原因は不明であるが、バックグラウンドが高いことによる影響が考えられた。index 値が算出されて判定を行うことから、このようなケースでは偽陰性となることも考えられるため、バックグラウンド値を確認するなどの注意が必要である。

⑤ まとめ: LABScreen 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。今回、SH3001 は LS-SA にて B*44:02 ビーズとの強い反応が認められたが (平均 nMFI: 9,944)、B*44:02 のリンパ球とは反応しないなど、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 (SH3003: 移植患者) と DNA 試料 (H3003: 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: 27 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、LS-SA の平均 nMFI および WAKFlow HR (以下、WAK-HR) の平均 Calmed からクロスマッチ陽性となる抗体特異性を解析した。A*24:02 (平均 nMFI: 8,551, 平均 Calmed: 1,915), B*44:03 (平均 nMFI: 8,108, 平均 Calmed: 3,376), B*51:02 (平均 nMFI: 17,679, 平均 Calmed: 14,970), DRB1*13:02 (平均 nMFI: 2,648, 平均 Calmed: 885), DQB1*03:03 (平均 nMFI: 17,240, 平均 Calmed: 5,971) との反応が予想

された。また、DQA1*03:02 に対する反応は否定されていなかった。

• DQB1*03:03 に対する反応: 患者の HLA Class II の抗体検査を実施し、ドナーの DRB1 タイピングを実施、DQB1 タイピングが未実施の施設は 11 施設であった。ドナーは DR9 (DRB1*09:01) で、日本人のハプロタイプ頻度から DQ3, 特に DQ9 (DQB1*03:03) が考えられる。LS-SA における DQ3 の平均 nMFI は全て 10,000 を超えていることから、ドナーの DQB1 タイピングが未実施の場合でも DR9 とのハプロタイプ頻度から DQ3 を『反応が予想される特異性』として考慮する必要がある。DQB1 タイピングが未実施であった 11 施設中、1 施設が DQ に対する反応についてコメントされていた。

• DQA1*03:02 に対する反応: ドナーの DQA1 タイピングを実施した施設は 5 施設であった。反応が予想される特異性として DQA1*03:02 に対する反応は否定されていなかったが、DQA1*03:02 と判定した施設は、1 施設のみであった。

第22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 移植センター

²⁾ 日本移植学会 移植関連検査委員会 委員

1. 概要

日本組織適合性学会と日本移植学会が連携し、実施する全血クロスマッチ精度管理は今回で6回目となった。前年同様に同一全血サンプルからリンパ球を抽出し、QCWSで使用する血清とのクロスマッチを実施する精度管理である。

2. 経過

参加施設は年々増加傾向で、今年度は過去最高の44施設の参加であった。参加施設内訳は、臓器移植ネットワークの検査施設が27施設、移植関連病院が10施設、血液センター3施設、検査センター2施設、試薬メーカー1施設、研究所1施設であった。日本移植学会で準備した全血は、日本組織適合性学会の血清配布の一週間後に東京より各施設に発送した。全血サンプル(ACD-A液)7.5 mlは、翌日、翌々日には各施設に到着し細胞の生存率も概ね良好であった。9月中旬に集計結果を各施設にメールで配信、同月に開催された第21回QCWS(松本)、10月に開催された第54回日本移植学会総会(東京都)で解析報告を行った。また、平成31年2月に開催される第52回日本臨床腎移植学会(大阪)においても報告予定である。

3. 試料選択及び検査方法

ドナー候補(全血)は日本移植学会で準備し、日本人に高頻度なHLAタイプを準備した。レシピエント(血清)は、SH3004を選択した。この組み合わせは、第2回と同じ組み合わせであり、データを比較する目的で再度採用した。SH3004はA*24:02 (nMFI=14,102), DRB1*09:01

(nMFI=19,073), DRB1*12:01 (nMFI=17,430)の抗体特異性を認め、これらがドナー特異的抗体 Donor Specific Antibody; DSA となる想定で選定した。検査方法は、FCXMが最も多く全体の7割の施設で実施され、CDCとICFAは4割程度であった。検査方法の組み合わせとしてCDC+FCXMが14施設と最も多く、次いでFCXM単独が10施設、FCXM+ICFAが8施設であった。プロトコルに関しては、各施設プロトコルと学会推奨の全血クロスマッチプロトコル(案)の2つを選択できるようにした。各施設の方法における詳細な検査条件はアンケート調査を行いまとめた。詳細は、学会公式サイトを参照して頂きたい。

4. 結果

ほとんどの検査法において80~90%の高い一致率であったが、CDC-Bは他法に比べ一致率75%とやや低かった。FCXMは強陽性を想定しての組み合わせであったが、陰性と判定した施設もあった。プロトコル別の比較では、ICFAにおいて第2回では陰性と判定した施設が多数であったが、今回は陽性と判定した施設が多数であった。これは、ICFAの試薬組成を改良されたことを反映した結果と推測される。

5. まとめ

例年同様に高い一致率であったが、一部の施設においては問題となる判定も散見する状況である。サンプルの組み合わせとしてはFCXMで強陽性となることを想定しているので、陰性と判定された施設においては各自で原因の確認をお願いしたい。