

第24回 HLA-QC ワークショップレポート

第24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—

高 陽淑¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

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

第24回ワークショップの開催案内は、2019年12月には公式サイトに、2020年1月には学会誌に掲載され、同時にQCWS事務局より前回の参加施設代表者宛にメールにより通知した。第24回の参加施設は88施設となり、昨年よりも2施設増加した(表1)。88施設の参加内容内訳は、DNA-QCに77施設、抗体-QCに69施設、日本移植学会連携クロスマッチを含むクロスマッチに48施設であった(重複参加を含む)。

第28回大会中に開催されたQCWS部会で決定した基本方針に従い、DNAおよび抗体サンプルの担当者が協議して選択したQCWSサンプルは、4月7日に参加施設宛に発送、QCWS結果入力シートは、解析の方針に対応して前年度からの改訂版を作成して参加施設代表宛にメールで配信した。

また、第22回から判定結果に適用されている新表記法についても、標準化委員会を中心に内容が見直され、「HLA推定アレルギー一覧表(JSHI)2020年度版」として更新した。

第24回QCWSの結果提出は6月1日を締め切りとし、6月中に事務局による提出データの内容確認、およびデータ集約作業を終了して、6月15日に解析用データ

を担当者宛に郵送した。

解析については、参加申し込み時に各施設が記入した臨床部門(輸血、臓器移植、造血幹細胞移植、その他)分類に従った部門別、また各施設が用いた検査方法別に、それぞれ比較検討されている。

DNAおよび抗体の解析担当者は7月~8月の二ヶ月間、各自で実施した詳細な解析を基に、リーダーを中心としたグループ内でのメールディスカッションを重ねて解析報告集を作成した。また、同時に例年CDで配布していた全データ集を完成させ、解析報告集と共にZIP形式にまとめて、参加施設がダウンロードできる形式で9月10日に公式サイトに掲載した。

本来であれば、大会会期中に開催されるQCWS集会で、解析結果の重要ポイントについて解説していたが、今回は大会延期に伴う集会の代行措置として、ポイント解説集(ノート付きPPTファイル)を期間限定(9月21日~9月30日)で公式サイトに掲載した。

さらに、QCWS集会事前参加登録者に対しては、ポイント解説集の閲覧時に取得するキーワードを期限内(9月21日~10月9日)にQCWS事務局に報告することでQCWS集会参加証明書の発行要件とした。

今回、ポイント解説集の閲覧後に協力を求めたアンケート調査では、公式サイトからのダウンロードあるい

[#] 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⁾、高 陽淑²⁾、石塚 敏³⁾、一戸辰夫⁴⁾、内田みゆき⁵⁾、奥平裕子¹⁾、木村彰方⁶⁾、黒田ゆかり⁷⁾、小林孝彰⁸⁾、田中秀則⁹⁾、橋口裕樹¹⁰⁾、藤井明美¹¹⁾、藤原孝記¹²⁾、宮崎 孔¹³⁾、湯沢賢治¹⁴⁾

¹⁾ ジェノダイブファーマ株式会社 ゲノム解析部門、²⁾ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター、³⁾ 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室、⁴⁾ 広島大学 原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野、⁵⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所、⁶⁾ 東京医科歯科大学 統合研究機構リサーチコアセンター、⁷⁾ 日本赤十字社 九州ブロック血液センター、⁸⁾ 愛知医科大学 医学部 外科学講座、⁹⁾ 公益財団法人 HLA 研究所、¹⁰⁾ 日本赤十字社 福岡赤十字病院、¹¹⁾ 県立広島病院 臨床研究検査科、¹²⁾ 帝京大学 医学部附属病院 輸血部、¹³⁾ 日本赤十字社 北海道ブロック血液センター、¹⁴⁾ 国立病院機構水戸医療センター 臨床研究部 移植医療研究室

表1 第24回HLA-QCWS参加施設(受付順)

1	社会医療法人 北権会 札幌北補病院	臨床検査科	43	帝京大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター
2	茨中医療センター	臨床検査科	44	獨協医科大学病院	臨床検査センター
3	公財 鹿嶋臨海研究所弘前病院	HLA検査部	45	東京女子医科大学	中央検査部移植関連検査室
4	大阪大学医学部附属病院	輸血部	46	広島大学病院	輸血部
5	札幌医科大学附属病院	検査部	47	東京医科大学八王子医療センター	中央検査部
6	がん・感染症センター 都立駒込病院	輸血・細胞治療科	48	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
7	九州大学病院	遺伝子・細胞療法部	49	東京医科歯科大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター
8	北海道大学病院	検査部	50	株式会社ベリタス	バイオサイエンス本部 技術グループ
9	京都府立医科大学附属病院 腎移植センター	輸血・細胞医療部	51	大阪急性期・総合医療センター	移植支援検査センター
10	宇和島徳洲会病院	検査科	52	山形大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部
11	株式会社ピー・エム・エル	第三検査部 ゲノム検査課	53	県立広島病院	臨床研究検査科
12	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	54	岩崎大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部
13	山形県立中央病院	輸血部	55	亀田総合病院	臨床検査部
14	金沢医科大学病院	北陸移植HLA検査センター	56	日本赤十字社九州ブロック血液センター	品質部 検査二課
15	熊本大学病院	中央検査部	57	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部
16	北里大学病院	輸血部	58	公益財団法人 HLA研究所	技術部 検査課
17	日本赤十字社	血液事業本部 中央血液研究所 研究開発部	59	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部
18	独立行政法人地域医療機能推進機構 中京病院	検査部	60	熊本赤十字病院	検査部
19	東邦大学医療センター大森病院	輸血部	61	株式会社 医学生物学研究所	信頼性保証部 品質管理室
20	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	62	高知県・高知市病院企業団立高知医療センター	医療技術局 血液管理科
21	福岡赤十字病院	移植センター	63	県立宮崎病院	臨床検査科
22	静岡県立総合病院	検査部	64	京都大学医学部附属病院	検査部
23	鹿児島大学病院	輸血・細胞治療部	65	湧水製薬株式会社	試薬・診断薬事業部
24	市立札幌病院	検査部臨床検査課輸血係	66	名古屋第二赤十字病院	組織適合検査室
25	松江赤十字病院	検査部	67	碧石医科大学附属病院	中央臨床検査部
26	横浜国立大学附属病院	輸血・細胞治療部	68	香川県立中央病院	中央検査部
27	独立行政法人 地域医療機能推進機構 仙台病院	検査部	69	伊勢赤十字病院	医療技術部 臨床検査課 輸血検査室
28	千葉大学医学部附属病院	輸血・細胞療法部	70	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
29	東海大学医学部附属病院	臨床検査技術科 輸血室	71	関東甲信越ブロック血液センター	検査部 検査三課
30	沖縄県立中部病院	検査科	72	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
31	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	73	藤田医科大学病院	輸血部
32	佐賀大学医学部附属病院	検査部	74	関西医科大学附属病院	輸血・細胞療法部
33	株式会社LSIメディアエンス	遺伝子解析部 遺伝子検査グループ	75	株式会社エスアールエル	マーケティング企画課兼ゲノム解析課
34	ジェノタイプファーマ株式会社	輸血部	76	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
35	大分県立病院	輸血部	77	信州大学医学部附属病院	輸血部
36	株式会社プロセル	メディカル部	78	弘前大学病院	泌尿器科
37	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	79	高山大学附属病院	検査・輸血細胞治療部
38	長崎大学病院	細胞療法部	80	愛知医科大学医学部	腎移植外科
39	徳島大学病院	輸血・細胞治療部	81	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
40	東京大学医学部附属病院	輸血部	82	湘南鎌倉総合病院	検査部
41	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	83	旭川医科大学病院	臨床検査・輸血部
42	岡山大学病院	輸血部	84	三重大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部

は、QCWS事務局からのメール添付によりフォーマットを取得して、メール添付による返送という形式であったため、取得件数が64件と昨年の58%程度となったが、その分析結果はQCWS部会内で共有し今後のQCWSに役立てる。

2. QCWSのテーマおよび試料選定について

前述のとおりQCWS部会で決定した第24回QCWSテーマ(以下に示す)に従って、DNAおよび抗体ともにサンプル担当間で協議し決定している。

DNAのテーマは①DNA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、③DNAタイピング結果に対応したHLA抗原型を正確に読み替えること、の3点である。

これらのテーマに適合するサンプルとして、細胞バンクから購入済みの細胞で使用履歴の無い細胞を中心に、これまでに無いまたは経験が少ないこと、第23回QCWSの誤判定を考慮していること、読み替えの知識を確認できること、などを意識したアレル構成である細胞を選択した。

サンプル調整については、例年通り、培養した選定細胞から抽出したDNAを70~100ng/μLに濃度調整したものを濃度非公開で100μL(SSP実施施設は200μL)、

SSO法を対象とした陰性コントロール(DNase free water) 50μL、をそれぞれ参加施設に配付した。

一方、抗体のテーマは、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点である。

本学会からの依頼により日本赤十字社が保管管理している献血者由来の在庫検体から、以上のテーマに適合するサンプルとして4本選択し、その全てを抗体有無の検査対象に、4本中1本を仮想クロスマッチ対象サンプル、別の1本を移植学会連携全血クロスマッチ対象サンプルとして抗体特異性同定検査対象(計2本)とした。

サンプル調整は例年通り、血清化処理後、4種類のサンプルを参加施設に1mL配布した。

クロスマッチについては、抗体-QCとDNA-QCの測定結果から正しく適合判定ができることをテーマとした仮想クロスマッチとし、日本移植学会連携の全血クロスマッチについては、抗体-QCの対象サンプルから1本を共用して、これまでと同様に実施した。

3. 解析報告と担当者

今回の解析担当者は、DNA-QCでは試料説明・総合解析とSBT法が新任でそれ以外は昨年からの継続担当

とし、抗体-QCではFCM法のみが新任、それ以外は昨年からの継続で担当した（担当者一覧を次頁に示す）。

解析結果については、1. ワークショップの経過で述べたとおり、個々の担当別に一次解析の結果を元にグループ内でディスカッションを重ねて作成した解析データ集と、参加施設の全データ集とを公式サイトに掲載し、本学会誌へのレポート投稿により公表している。

解析の方針や詳細については、これらの内容を参照されたい。

【DNAタイピング結果解析】

・試料説明，総合解析

ジェノダイブファーマ 奥平 裕子

・SSP法

沖縄県立中部病院 井上 新吾

・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

日本赤十字社中央血液研究所 高田慎之介

【抗体検査結果解析】

・試料説明，総合解析

東京女子医大 石塚 敏

・FCM (FlowPRA) 法

九州大学病院 亀井 美沙

・抗体ルミネックス法①[#]

国立病院機構 宇多野病院 成海 仁在

・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

・その他の検査 (MPHA)

近畿ブロック血液センター 高 陽淑

・仮想クロスマッチ

関東甲信越ブロック血液センター 宮城 徹

・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

今回のQCWS全サンプルの総合解析結果を表2, 3に示した。

DNAサンプル(表2)については、主に参加施設の結果より総合的にリアサインした。

なお、表記は本学会標準化委員会作成『HLAタイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則(2017年版改訂1.1版)』に従っている(表2)。

抗体サンプルについては、『HLA推定アレル一覧表(JSHI)2020年度版』において、HLA遺伝子頻度0.1%以上の抗原*を対象に参加施設が決定した総合判定結果を集計して、Consensus(各施設の判定結果の2/3以上のスコア)を求めた。ただし、Consensusが得られない抗原(各施設の判定結果の集計が2/3に達しない)はスコア4と表示している(表3)。

参加施設が、これらの結果を日常検査における精度管理に活用されることを期待する。

表2 第24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	
Q24D1	A*24:02:01:01 A24	A*26:01:01:01 A26	B*40:02:01:01 B61	-	C*03:04:01 Cw10	-
Q24D2	A*02:06:01:01 A2	A*24:02:01:01 A24	B*07:02:01:01 B7	B*38:02:01:01 B38	C*07:02:01:01 Cw7	C*07:02:01:03 -
Q24D3	A*11:01:01:01 A11	A*24:02:01 A24	B*15:07:01:01 B62	B*48:01:01:01 B48	C*01:02:01:01 Cw1	C*03:03:01:01 Cw9
Q24D4	A*11:01:01:01 A11	A*24:02:01 A24	B*15:01:01:01 B62	B*51:01:01:01 B51	C*04:01:01 Cw4	C*14:02:01 Cw14*

HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
Q24D1	DRB1*09:01:02 DRB4*01:03:02 DR9 DR53	- - - -	DQA1*03:02:01 DQB1*03:03:02	- -	DPA1*02:02:02 DPB1*05:01:01	- -
Q24D2	DRB1*01:01:01 DR1	DRB1*08:03:02 DR8	DQA1*01:01:01 DQB1*05:01:01	DQA1*06:01:01 DQB1*03:01:01	DPA1*01:03:01 DPB1*04:02:01 (DPB1*463:01:01)# DPw4	DPA1*02:01:01:02 DPB1*14:01:01 (DPB1*854:01)# DPw14*
Q24D3	DRB1*04:03:01 DRB4*01:03:01 DR4 DR53	DRB1*04:05:01 - DR4	DQA1*03:01:01 DQB1*03:02:01	DQA1*03:03:01 DQB1*04:01:01	DPA1*01:03:01 DPB1*02:01:02	DPA1*02:02:02 DPB1*02:02:01
Q24D4	DRB1*04:06:01 DRB4*01:03:01 DR4 DR53	DRB1*14:03:01 DRB3*01:01:02 DR14 DR52	DQA1*05:03:01 DQB1*03:01:01	DQA1*03:01:01 DQB1*03:02:01	DPA1*01:03:01 DPB1*02:01:02 (DPB1*414:01:01)# DPw2	- DPB1*05:01:01 (DPB1*744:01)# 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
#NGSで解消できなかったアレル(参考)

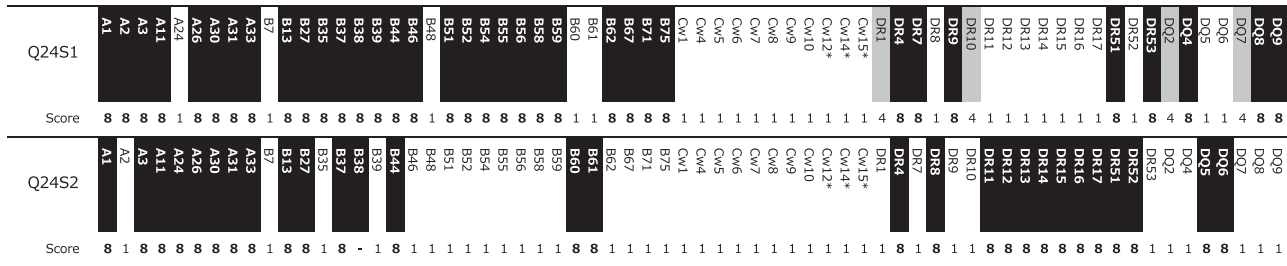
表3 第24回HLA-QCワークショップレポート：抗体サンプルの総合結果

抗体検出

	HLA class I 抗体				HLA class II 抗体			
	Q24S1	Q24S2	Q24S3	Q24S4	Q24S1	Q24S2	Q24S3	Q24S4
Score 8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95.3%	100%
Score 4	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Score 1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	4.7%	0%

抗体特異性

<日本人HLA遺伝子頻度0.1%以上の抗原に対する反応>



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)

第 24 回 HLA-QC ワークショップレポート —試料説明 DNA-QC—

奥平 裕子¹⁾

¹⁾ ジェノダイブファーマ株式会社

1. 使用する試料について

日本組織適合性学会の HLA-QC ワークショップでは、市販品もしくは細胞バンクより入手した匿名化試料を保管して、DNA-QC の試料として使用している。その中から HLA-A, B, C, DRB1 のタイピング結果と QCWS 集会でのアンケート調査結果を参考に、以下のポイントを課題として本年度の試料を選定した。

2. 24 回 DNA-QC 細胞選定のポイント

本年度の試料選定のポイントは、以下の 3 点である。1 点目は「ホモ試料でのタイピングが正確に行えること」を課題とした。2 点目は DR のハプロタイプの確認である。DR1, DR8 との連鎖不平衡より、「DRB3, 4, 5 を保有しない結果を導きだせるか」を課題とした。最後 3 点目は、昨年 の 23 回 DNA-QC での「誤判定が改善されてい

るか」と、反応性の比較」を課題とした。

3. 配布試料

本年度は初の試みとして、ポイントに従って選定した 4 つの DNA 試料の濃度を非公開とすることとした。各タイピング法に適した濃度で検査が実施されているかを図る目的である。またこの他に 21 回 QCWS からデータ提出が必須となっている、SSO 法で同時測定するための陰性コントロールの配布も引き続き行うこととした。配布開始当初から陰性コントロールにも関わらず反応がみられる施設が多数あり、コンタミネーションが疑われるため課題となっていた。

以上より濃度非公開の 4 検体と SSO 法用の陰性コントロール (DNase free Water) 1 検体の計 5 つを配布試料として選定した。

第 24 回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析（表記含む） DNA-QC—

奥平 裕子¹⁾

¹⁾ ジェノダイブファーマ株式会社

1. 概要

DNA-QC の参加施設数はここ数年横這い傾向にあったが、今年度は昨年 の 75 施設から 2 施設増加し 77 施設の参加であった。部門別では臓器部門が 56 施設、輸血部門は 39 施設、造血部門は 31 施設、およびその他が 6 施設（重複有）の参加で、臓器部門は昨年 の 52 施設から 4 施設伸ばし増加傾向であった。方法別では輸血、造血部門で SSO 法が 90% を占めたのに対し、臓器部門では SSO 法が 70% に留まり、SSP 法が他方との併用を含めて 38% を占めていた。評価対象遺伝子は、例年同様 HLA-A, B, C, DRB1 とし、その他の DRB3, 4, 5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 は評価対象外とした。

2. 総合結果評価

1) 判定結果の評価

評価項目は以下の 2 点とした。1 点目「各タイピング法での判定が正しいこと」、2 点目「各タイピング法の結果が、総合判定と齟齬がないこと」、この 2 点について○と×の二段階（60 点満点）で評価を行った。全施設の評価平均は 59.8 点を示し、概ね良好な結果であった。詳細については、各方法別解析を参考にさせていただきたい。

2) 結果表記の評価

学会の規定する表記法「HLA タイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則（2017 年版）」の改訂が 2019 年 4 月 1 日に行われた（1.1 版）。これに基づきタイピング結果を記載することとしている。その評価項目は以下の 3 点としており、1 点目「アンビギュイティ(Ambiguity)の表記」、2 点目「HLA 型への読替え」、3 点目「その他の DNA タイピング結果表記について」、これらについ

て正、一部不備（減点なし）、誤（減点あり）の三段階（40 点満点）で評価を行った。全角入力や記号の誤入力など再確認で解消できる誤表記が多く見られた。しかしながら全施設の平均は 39.6 点を示し、良好な結果であった。昨年以上に 2017 年に制定された新表記法への理解が深まったといえるのではないだろうか。

3) HLA タイピング結果評価点

評価基準で定義されている評定は、1) 判定結果の評価（60 点満点）と 2) 結果表記の評価（40 点満点）を合わせて HLA タイピング結果評価点（100 点満点）とし、100 点＝評定 A、60 点以上 100 点未満＝評定 B、60 点未満＝評定 C の三段階で総合評価を行った。その平均は 99.4 点を示し、評定 A の施設が全体の約 70% を占め、概ね良好な結果であった。しかし、残り 30% の評定 B であった施設については特に、安定した技術と知識の習得に努めていただきたい。

3. 試験結果の評価（試験法別評価）

試験結果の評価は、使用試薬での結果の妥当性を評価するものである。提出データにおいて A（不備無し）、B（一部の不備）、C（全体的な不備）の 3 段階評価を行い、タイピング結果に影響を与えるようなデータの不備がないかを確認した。A 評価が 81 施設、B は 9 施設、C は該当施設なしであった。B 評価であった施設のうち 4 施設が SSO 法、5 施設が SSP 法であった。詳細については、各方法別解析を参考にさせていただきたい。

4. まとめ

1) 23 回 DNA-QC で明らかになった課題の達成状況

23 回 DNA-QC では SSO 法での陰性コントロールの実施状況とコンタミネーションが疑われる誤反応や、根拠

のないカットオフ変更が課題となっていた。陰性コントロールのデータ提出は、全施設で行われており課題は達成したといえる一方、その反応はコンタミネーションが疑われる施設が散在していた。また根拠のないカットオフ変更も複数の施設でみられた。SSP 法や SSO 法での反応不良による誤判定と、表記ミスによる誤判定も引き続いて課題となっており、検査を行う上で安定した技術と知識が重要であることが顕著に表れる結果となっていた。

2) 濃度非公開の DNA 配布

正確な DNA タイピングを行う上で、至適濃度で検査を行うことはとても重要である。また PCR 法を原理としている検査法全てにおいて、DNA の質も重要なポイントとなりうる。日常検査でも DNA の濃度を測定し、どのような量と質の検体であるのかを知った上での検査を推奨したい。

第 24 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査方法別解析 DNA タイピング SSP 法—

井上 新吾¹⁾

¹⁾ 沖縄県立中部病院 検査科

1. 概要

1) 参加状況

SSP 法での参加施設は 23 施設で昨年と同じであったが、データ提出が遅れた 1 施設を除いて 22 施設を対象に解析をおこなった。このうち 21 施設は臓器移植部門のある施設であり、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。SSP 法単独の参加は昨年より 4 施設減って 17 施設であった。

2) 使用試薬

MicroSSP (One Lambda 社) の使用が多く (20 施設)、中でも MicroSSP JPN の使用が 17 施設と最も多かった。

2. 解析方法

各施設から提出された反応パターンとそこから得られる判定結果、アレル表記について解析を行った。詳細なデータは学会公式サイト第 24 回 QC ワークショップ解析報告集を参照していただきたい。

3. 解析結果および考察

1) 配付試料の DNA 濃度を測定した施設は昨年の 4 施設 (17%) から 13 施設 (59%) と大幅に増加し、適宜希釈調製して検査されていた。

2) 判定には解析ソフトの使用が望ましい。古いバージョンのカタログファイルやアレルフィルターを使用していた施設は昨年の 6 施設から 2 施設に減少した。解析

ソフトを使用する際、設定が最新の状態であるか確認をしていただきたい。

3) 解析ソフトを用いつつ、早見表を併用することでより具体的な表記をしている施設も 2 施設確認できた。

4) 反応の不備による false negative があった施設は 2 施設あり miss assign にもつながっていた。一部反応不良があった施設も見られた。検査手技の見直し、機器の動作状況の確認など原因の究明が必要である。一方で検査そのものに問題がなくても、解析ソフトへの誤入力等によって miss assign をした施設もあった。

5) 反応パターンに問題がなくても Ambiguity を正しく理解しておらず、結果として miss assign をしている施設は 2 施設あった。解析ソフトで得られた結果の正しい解釈、解析ソフトの特性を知ることが大事である。

4. まとめ

SSP 法の結果は概ね良好であった。ただし反応パターンが正しくても、解析ソフトの設定が最新でないと結果も異なってくる。また Ambiguity や推定アレルの意味をきちんと理解したうえで表記には注意されたい。

アレル表記において『*』や『:』、『/』のほかにも全角半角の違い、カラムの順番など細かい部分でのミスが多く見られた。

第 23 回と比較して、アレル表記が難しくなりがちな低解像度の検査キットでも正しく表記されている施設が増えた。全体的に表記法の理解度は高まったと思われる。

第 24 回 HLA-QC ワークショップレポート — 検査方法別解析 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

1) 参加状況

LABType の参加施設は、全 77 施設中 9 施設 (11.7%) であり、昨年度 (14.7%) と比較して減少していた。

2) 試薬キットおよびローカス測定状況

各施設の試薬キット使用状況およびローカス測定状況についての詳細は、学会公式サイトの第 24 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
- カットオフ値の変更状況

詳細は、学会公式サイトの第 24 回 QC ワークショップ報告集をご参照いただきたい。

3. 今年度の解析ポイント

再現性のない False 反応および再現性のある False 反応について詳細を示す。

1) 再現性のない False 反応 (False positive と False negative)

D2438 の検体 Q24D2 (HLA-A) および検体 Q24D3 (HLA-DRB1) は自動判定で判定不能であった。判定不能の原因は、Q24D2 (HLA-A) では False positive, 検体 Q24D3 (HLA-DRB1) では False negative であり、両者とも再検査により自動判定で判定可能となった。

再検査で False positive や False negative は改善される

ことがあることから、再検査をしてビーズ反応の再現性を確認する必要がある。

2) 再現性のある False 反応 (False positive)

D2408 は、検体 Q24D1 (HLA-DRB1) を DRB1*09:01, DRB1*09:15 と判定していた。DRB1*09:15 が日本人頻度で 0.01% 未満であることから、#980 ビーズ (以下 #980) の反応を False positive と疑い再検査を実施し、再現性が認められたことからの G2 (Group 2: Frequent on one or other of the alleles only) 判定であった。

同一ロットを使用した D2433 と D2461 の #980 は、D2408 と同様に陽性であったが、カットオフを変更して DRB1*09:01, - と G1 (Group 1: Frequent on both alleles) 判定していた。なお、2 施設共に再検査による再現性の確認はなかった。

同一ロットを使用した 3 施設の自動判定はすべて DRB1*09:01, DRB1*09:15 であり、判定結果の相違は検査手技ではなく、#980 の陽性反応を False positive としたかどうか起因する。

Beads info より #980 は、DRB1*09:15 に特異的なプローブであることがわかる。また、メーカー QC より DRB1*09:XX のアレルを持つとき Normal value が高い傾向が示されていることから、DRB1*09:XX のホモ接合体の場合は False positive になることが推測される (その後のワンラムダの検証で、#980 は DRB1*09:01 のホモ接合体で False positive になることを確認したとの報告あり)。

D2408 の結果は、#980 の再現性を確認した上での G2 判定であったが、#980 のビーズ情報や DRB1*09:15 のアレル情報について調べた上で総合的に判定する必要がある。一方、D2433 および D2461 では、G1 判定になるように #980 のカットオフを変更していたが、再現性の確認をし、カットオフ変更の根拠を示すべきであった。

自動判定で判定した場合は判定を誤る可能性、G1 判定に合わせるようにカットオフを変更した場合は、レアアレルや新規アレルを見逃す可能性がある。

3) 判定する際の注意事項

- 再検査で再現性を確認する。
- カットオフ変更が必要な場合はその根拠を明らかにする。
- 得られた結果に再現性があっても、結果に納得できない場合は情報収集し、総合的に判断する。

4) 判定困難な検体の判定

- 人種、頻度、common allele との塩基配列、アミノ酸配列、ハプロタイプの違いなどのアレル情報を調べる。
- False positive や False negative の可能性など、ピーズ情報を調べる。
- False positive や False negative の有無など、ピーズ情報をメーカーに問い合わせる。
- HLA タイプ既知の検体があればその反応性を確認する。

疑った結果に再現性があってもそのまま結果を記入することなく、できる限りの情報収集をして総合的に判定することが必要と考える。

5) まとめ

- False 反応を疑ったときは、その再現性を確認する。

- 再現性が認められても、結果に疑いが残るときは、アレル情報やピーズ情報を調べ、試薬に疑いがある場合はメーカーへ問い合わせをするなどし、集めた情報から総合的に判断する。
- カットオフを変更する場合はその根拠を明らかにする。安易にカットオフを変更することで、レアアレルや新規アレルを見逃す可能性があることを常に意識する。
- SSO は試薬の特性上、判定結果に限界があることを理解するとともに、他方法で確認できる体制を整えておくことが望ましい。

4. SSO で正しい判定をするために

SSO は、技術が安定していれば、ほぼ迷うことなく判定可能である。しかし、稀に遭遇する判定困難な検体の判定には、HLA に関する多くの知識を必要とする。少しでも判定に迷いが生じた場合は、できる限りの情報収集をして総合的に判定する必要がある。

次に示した3つの努力を心がけながら、日々検査をしていただきたい。

技術：検査技術を高める努力

知識：HLA に関する知識を高める努力

行動：判定に必要な情報を集める努力

第 24 回 HLA-QC ワークショップレポート — 検査方法別解析 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 77 施設中 SSO (Luminex) 法での参加施設は 57 施設 (74.0%) であった。このうち、試薬キットの WAKFlow の使用が 47 施設で昨年より 5 施設増加しており、GenoSearch の使用が 4 施設で昨年より 1 施設減少していた。検査実施状況は、WAKFlow または GenoSearch を実施した施設において、SSO 法の他の試薬キットまたは SSP 法および SBT 法を併用していた施設は WAKFlow で 6 施設、GenoSearch で 2 施設であった。

2) 対象ローカス

WAKFlow を使用した 47 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 43 施設、HLA-C が 42 施設、HLA-DQB1 が 28 施設、HLA-DPB1 が 11 施設で実施されており、HLA-DQA1 が 1 施設で実施されていた。

GenoSearch を使用した 4 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複数のロットが使用されていたが、明らかなロット間差は見られなかった。

3) DNA サンプルの使用状況

DNA 濃度測定については、多くの施設が DNA 濃度を測定されていたが、測定されていない施設も複数あり調製 (希釈) されずに使用されていた。判定結果への影響は見られなかったが試薬キットに応じた至適濃度で使用することが望ましい。

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) 陽性コントロールビーズの蛍光値 (平均とばらつき)

3) ビーズカウント (平均とばらつき)

4) P/N 比 (Pmin/Nmax)

詳細は、学会公式サイトでの第 24 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) 陰性コントロールの蛍光値 (平均とばらつき)

陰性コントロールの意義は、コンタミネーションの有無を確認することができ、正しく試験操作を実施した確認のひとつになることである。今回コンタミネーションが疑われる反応が 3 施設で見られ、1 施設においては同一バッチ内のサンプルと同様な反応が見られた。このような反応を無視することは誤判定に繋がる危険性があるため、原因調査を行い原因に応じて対応 (使用器具や作業環境の清掃、試験操作手順の見直し等) し、再検査の実施を推奨する。

2) 陽性コントロールビーズの蛍光値 (平均とばらつき)

蛍光値のばらつきによって %CV が高値を示した施設が複数見られた。原因は、試験操作 (手技や手順) による影響が大きいと推察され、誤判定に繋がる危険性がある。判定の際には、陽性コントロールビーズの反応を確認し低値あるいはアンバランスの場合は再検査の実施を推奨する。

3) ビーズカウント (平均とばらつき)

ビーズカウント不足 (Sample Empty) の状態で判定されていた施設があった。判定結果に影響する可能性は低いですが、試薬または装置に問題がある可能性があるため日常的にこれらを適正に管理する手順等が必要と思われた。また、一つのビーズだけカウント数が大幅に多くなっていた施設もあり、原因が特定できない場合は各メー

カーに問い合わせることを推奨する。

4) P/N 比（陽性の最低値と陰性の最高値の比）

P/N 比は、反応のメリハリが少なく、陽性と陰性の差が不明瞭の場合に低くなる。そのためカットオフ値を変更して判定される施設があったが、ここ数年は減少傾向にある。参加されている施設（担当者）の技術向上や手順、試薬、装置等の管理が適正に行われてきているのではないかと推察された。

4. まとめ

今回の結果から、改善または改善傾向が見られたことが 3 点あった。①初めて対象の全施設から陰性コント

ロールデータが提出された。陰性コントロールの測定を必須とする意義が浸透したと推察された。②表記ミスや誤判定が減少傾向にある。メーカー対応と参加者の表記法の理解および技術習得が進んだことが結果に反映されたと推察された。③カットオフ値を変更し判定された施設数が減少傾向にある。参加施設の技術向上と試薬および機器等の周辺環境の改善があったと推察された。一方、問題点としてコンタミネーションや反応不良等は今後も継続課題である。信頼性の高い結果を報告するためには「適正に管理され正確に実施されて得られた検査データであること」を証明できるよう心掛ける必要がある。

第 24 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査方法別解析 DNA タイピング SBT 法—

高田慎之介¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

1. 概要

1) 参加状況

全 77 施設中 Sanger 法での参加施設は昨年度同様 3 施設 (3.9%)、NGS 法での参加施設は 1 施設増の 5 施設 (6.5%) であった。

2) 試薬キット (判定ソフト) および検査対象領域

Sanger 法では SeCore (uTYPE7.1) が 2 施設、AlleleSEQR (Assign-SBTv4.7) が 1 施設であった。SeCore を用いた 2 施設の検査対象領域は、HLA-A では exons 2-4 または exons 1-5 を、-B では exons 1-4 または exons 1-5 を、-C では exons 2-6 または exons 1-7 をそれぞれ対象としており、-DRB1 では exons 2-3 を、-DQB1 では exons 2-3 を、-DPB1 では exons 2-4 を両施設ともに対象としていた。AlleleSEQR を用いた施設は HLA-A、-B、-C 共に exons 2-4 を、-DRB1、-DPB1 は exon 2 を、-DQB1 は exons 2-3 を対象としていた。

NGS 法では AllType NGS (TypeStream Visual) が 3 施設、ScisGo HLA (GeMS-UI) が 2 施設であった。AllType NGS を使用していた施設では HLA-A、-B、-C、-DQA1、-DPA1 については Full gene 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 を用いた施設では A、B、C が exons 1-7 を、-DRB1/3/4/5、-DQB1、-DPB1 および -DQA1 が exons 1-4 を、また DPA1 のみ exons 2-4 を対象としていた。

3) 参照配列

Sanger 法では各施設異なる参照配列を用いており、最新の参照配列 (2020 年 6 月当時 ; 3.39.0 Jan) の使用は 1 施設のみであった。NGS 法では AllType NGS を用いた 3 施設のうち 2 施設が 3.39.0 を、1 施設が 3.37.0 を使用

していた。ScisGo HLA を用いた 2 施設は 3.37.0 を使用していたが、2020 年 6 月当時の Sciscloud は 3.37.0 が最新版であった。判定には最新の参照配列を用いることを推奨する。

2. 解析項目

以下の項目について解析を行った。

- 1) Quality Value (Trace Score) -Sanger 法と NGS 法
- 2) Signal/Noise 比 -Sanger 法
- 3) リードデプス -NGS 法
- 4) カバー率・アレルバランス -NGS 法

詳細は、学会公式サイトの第 24 回 QC ワークショップ報告集をご参照頂きたい。

3. 結果と考察

1) Sanger 法における Quality Value (以下、QV) は、各施設の全ての検体で QV median ≥ 30 の良好なデータであることを認めた。また一部の sequence data (HLA-class I) に QV ≤ 20 を認めているが、その原因の多くがシーケンスの読み始め (primer3' 末端から数十ベース) の分離不良によるものと考えられた。

NGS 法における QV は各施設すべての検体で QV ≥ 25 の良好なデータであることを認めた。また、一部施設において total read count が検体間で 2.6 倍以上の差を認めたものの、少なくとも 60 万リード以上取得できているため、アレル判定への影響はないと考えられた。

2) Signal/Noise 比 (S/N) は各施設の検査で使用した sequence primer (Q24D1, D2 の DRB1 codon86 primer と Q24D3 の DPB1 codon85 primer を除く) で S/N ≥ 60 を認める良好なデータであった。S/N については施設間差が認められるが、測定機器の特性によるものと推測された。

3) リードデプスは各施設全ての検体で Average read depth ≥ 200 を認めており, key exon のベースコールは十分な厚みをもって判定できたと考える。また ScisGo 試薬を用いた2施設は同程度のリードデプスであったが, Alltype 試薬を用いた3施設では最大3.8倍程度のリードデプス差を認めており, 検査工程の煩雑さが反映したと考えられた。

4) 各施設のすべての検体でカバー率は97%以上, アレルバランスは0.3以上を認める良好なデータであった。

4. まとめ

Sanger 法においては表記ミスのある施設が見られたが, 試薬の反応性や判定結果は良好なデータであった。

NGS 法の QC も良好な結果であったが, 検査精度の維持・向上のためにもタイピング判定前にデータクオリティ (statistic data) の確認を推奨する。また, NGS の普及により HLA アレルの登録数は増加の一途を辿っているため, 参照配列の更新遅れは Ambiguity を見落とす危険があることから, 積極的な更新を推奨する。

第 24 回 HLA-QC ワークショップレポート —試料説明 抗体 QC—

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. 使用した抗体 QC サンプルについて

参加施設に配布した抗体 QC サンプルは、日本組織適合性学会から日本赤十字社へ譲渡依頼に承諾して頂き保管されている抗血清を対象サンプルとした。

その選定要件は、日本人に通常検出される抗体であること、一部の試料には HLA-C 座に対する抗体、IgM 性抗体、HLA 以外の非特異的の反応を示す場合がある抗血清を含むサンプルの中から選定した。また、今回は選択基準に過去の QCWS で使用履歴があるサンプルを含め、抗血清の特異性や在庫量などを考慮し担当者間で選定を行った。

2. 配布サンプル処理について

- 1) 血漿 50 mL にトロンビン 500 μ L 加えて転倒混和後、静置 (4°C/1 h)。
- 2) 竹串でフィブリン塊を取り除く。
- 3) 2) にトロンビン (1,000 U/mL) 250 μ L, 窒化ソーダ (10%) 500 μ L, フェノール・レッド (1%) 500 μ L を加えた。
- 4) 転倒混和後、静置した (4°C/Over night)。
- 5) 竹串でフィブリン塊を壊したのちに遠心した (2,000 g/5 min)。
- 6) フィルター (ミリポア : Millex-GV SLGV 033 RS

PVDF 0.22 μ m) と 10 mL シリンジを使用して濾過後、サンプルチューブに分注して発送した

3. 抗体 QC サンプル選定時のポイント

1) 抗体スクリーニングは、今年度 4 サンプルとし正確な判定が出来るかに重点をおいた。特に Q24S3 は過去に使用履歴があるサンプルを選定した。

2) 抗体特異性同定は、HLA Class I・Class II の判定がともに明確な特異性を示す 2 サンプルを選定した。

3) 仮想クロスマッチは、DNA-QC (Q24D1) と抗体 QC (Q24S1) をサンプルとして選定し、今年度は新しい試みとして提供ドナー細胞との反応性を強調する回答方式とし、各遺伝子座との反応性の予測やタイピング実施施設における特異性同定結果からの予測解析など可視化することを目指した。

4) 全血クロスマッチ (日本移植学会連携) は、日本移植学会から配布された ACD 液添加のヒト血液と抗体 QC (Q24S2) サンプルを選定し、特に配布されたヒト血液中の B 細胞に対する特異性を示す抗血清を選定した。

参加施設は、学会公式サイトに掲載した第 24 回 QCWS 解析報告集と全データを収納した ZIP ファイル、第 24 回 QCWS ポイント解説集を収納した ZIP ファイルと合わせて参照して頂きたい。

第 24 回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析 抗体 QC—

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

1) 参加施設の内訳

今年度の抗体 QC は、施設情報非公開であった 3 施設を除外して、病院・大学に属する施設 47 施設、血液センター 9 施設、検査センター・その他 7 施設であり、全体の 71% が病院・大学に属する施設であった。

部門別では、輸血関連部門 37 施設、臓器移植部門 43 施設、造血細胞移植部門 31 施設、その他 4 施設（すべての部門で重複あり）であった。また、前回からの継続参加は 60 施設（87%）であり、多くの施設が継続的に参加している状況であった。

2) 抗体スクリーニングおよび抗体特異性同定試験の内訳

抗体スクリーニング（抗体有無）は、FlowPRA Screening 22 施設、LABScreen Mixed・Multi 28 施設、LABScreen PRA 8 施設、WAKFlow Screen 13 施設、WAKFlow MR 17 施設、LIFECODES LMX 6 施設の参加であった（施設によって重複あり）。

抗体特異性同定は、LABScreen Single antigen (+Supplement・ExPlex) 46 施設、WAKFlow 特異性同定 18 施設、LIFECODES LSA 6 施設の参加であった（施設によって重複あり）。

2. 評価基準

日本人の HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の HLA 抗原について各施設から提出された結果が共通になるような割合を基準値と定義し現段階では 0.67 (2/3) とした。

基準値以上の構成比率を示す判定スコアを Consensus Result とし採点基準は、判定 Score が Consensus Result と一致すれば 1 点、Consensus Result 「8」の場合に「4」

であれば 0.5 点とした。

抗体スクリーニングおよび抗体特異性同定評価は、それぞれ共に評価 A（評価点範囲 80-100）・評価 B（評価点範囲 40-80）・評価 C（評価点範囲 0-40）とした。

3. 参加施設の集計結果

1) 抗体スクリーニング（抗体有無）

全部門での抗体スクリーニング（抗体有無）結果の一致率は、4 サンプル中 3 サンプル（Q24S1・Q24S2・Q24S4）で HLA Class I・Class II 共に全体一致率 100% であった。

Q24S3 では、HLA Class II において 62 施設中 3 施設が判定 Score1 であり全体の一致率 95.2% であったが HLA Class I は全体一致率 100% であった。

2) 抗体特異性同定

全部門での抗原別による抗体特異性同定結果の一致率は、全体にほぼ良好であったと思われるが一部の抗体で Consensus Result が保留（0.67 以下）になった。

Consensus Result が保留になった Q24S1 は、HLA Class II DR1 において 47 施設中 30 施設が判定 Score8 であり全体の一致率 64%、DR10 において 47 施設中 26 施設が判定 Score8 であり全体の一致率 55%、DR51 において 47 施設中 32 施設が判定 Score8 であり全体の一致率 68%、DQ2 において 47 施設中 22 施設が判定 Score8、5 施設が判定 Score4 であり全体の一致率 47%、DQ7 において 47 施設中 24 施設が判定 Score8、5 施設が判定 Score4 であり全体の一致率 51% であった。また、Q24S2 では、HLA Class I B38 において 50 施設中 22 施設が判定 Score8、2 施設が判定 Score4 であり全体の一致率 52% であった。

4. 評価結果

1) 抗体スクリーニング（抗体有無）

抗体スクリーニングは、69施設すべてが評価A(100%)であり、その内66施設が評価点100であった。

2) 抗体特異性同定

抗体特異性同定は、52施設中評価Aが50施設(96%)であり、その内5施設が評価点100, 評価Bが1施設(2%), 評価Cが1施設(2%)であった。

5. まとめ

抗体スクリーニングは、抗HLA抗体の有無を確認するための検査法であり、全施設が一致率100%になるべき項目であろうと思われる。しかし、一致率が100%にならなかったQ24S3は、SH2103として過去に使用履歴があるサンプルであり第13回QCWS解説集を参照して頂きたい。

抗体特異性同定は、全体の一致率においてほぼ良好で

あったと思われるが一部の抗体でConsensus Resultが保留になった。その要因としては、LABScreen Single antigen・WAKFlow HR・LIFECODES LSAの3試薬において、同一抗原でも含まれるalleleが試薬によって異なること、同一alleleであっても反応性が異なることなどがConsensus Resultに影響し、今年度においても全体の一致率を低下させた要因の一つであると思われた。

総合結果の記載に関して、今年度においても抗体特異性同定試薬のみで抗体スクリーニング判定をされていた施設、抗体特異性同定試薬と抗体スクリーニング試薬の2法でスクリーニング判定をされていた施設があった。QCWS部会としては、QCWS参考プロトコル集に従って頂き、抗体スクリーニングと抗体特異性同定用の試薬をそれぞれ選択して結果報告をお願いしたい。

参加施設は、学会公式サイトに掲載した第24回QCWS解析報告集と全データを収納したZIPファイル、第24回QCWSポイント解説集を収納したZIPファイルと合わせて参照して頂きたい。

第24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 FCM (FlowPRA) 法—

亀井 美沙¹⁾

¹⁾九州大学病院 遺伝子・細胞療法部

1. 概要

FlowPRA Screening の参加施設は Class I が 22 施設、Class II が 21 施設であった。参加部門（重複あり）の内訳は、輸血関連が 10 施設、臓器移植関連が 17 施設、造血幹細胞移植関連が 8 施設となった。他法との併用状況については、他の Screening 検査試薬や抗体特異性同定検査試薬を併用している施設が 14 施設、FlowPRA Screening を単独で使用している施設が 8 施設であった。測定機器の内訳は Beckman Coulter, Inc 製が 12 施設、Becton, Dickinson and Company 製が 10 施設となった。

ほとんどの施設において、血清処理（必須）として凍結融解・遠心は行われており、一部の施設においては、非特異反応吸着処理、熱非働化、EDTA 添加、DTT 添加が適宜行われていた。試薬（ビーズ）ロットは、全施設共通しており、Class I は Lot.018、Class II は Lot.021 であった。また、二次抗体のロットは Lot.042 や Lot.043 と、キット添付品が使用されており、いずれも使用期限は守られていた。

判定の際にヒストグラムの形状を使用している施設は 18 施設、%PRA とヒストグラムの形状を使用している施設は 4 施設あり、%PRA の数値のみで判定をしている施設は認められなかった。

2. 解析方法

検査状況記入表から、各施設の血清処理、試薬の使用期限、判定基準などを確認した。また、添付いただいた FlowPRA 画像を元に、各施設のヒストグラムの形状、マーカーの再設定位置、%PRA の差異などを確認した。

「QCWS 参考プロトコル抗 HLA 抗体検査 (FlowPRA)」

に従い、FlowJo™ を用いて QCWS サンプル 4 検体と NC・PC 血清の FCS (LMD) ファイルの再解析を行った。

3. 解析結果

FlowPRA Screening では、全施設において、QCWS サンプル 4 検体全てが Class I、Class II とともに陽性の判定（スコア 8）となり、一致率は 100% となった。

但し、%PRA は例年同様、かなりの施設間差が認められた。この施設間差について、測定機器・NC 血清ロット・二次抗体ロット・血清処理の点で比較を行ったが、いずれも特筆すべき傾向は認められなかった。

しかし、機器設定（Voltage・Count・Compensation）やマーカーの再設定については、やや不適切と思われる施設が認められた。OneLambda 社の「PRODUCT INSERT」や「QCWS 参考プロトコル抗 HLA 抗体検査 (FlowPRA)」を参考に、FCS (LMD) ファイルの再解析を行うと、%PRA の施設間差のほとんどは解消された。

操作や設定を見直しても %PRA の数値がばらつく場合は、「元々の発現量が少ない抗原（HLA-C・DQ・DP）に対する反応が、他のローカスに比べ弱くなりやすい」という各種 Screening 試薬における性質を念頭に、可能であれば他法を併用して、総合的に判断するのが望ましい。

なお、精度管理の点で解析を行ったところ、①（他法併用のため）NC 血清の測定が無く、マーカーの設定が他施設と異なり、%PRA が他施設と乖離した施設、② PC 血清の %PRA が低めのため（今回は直接の影響は認められなかったが）サンプルの偽低値に気づきにくいと思われる施設、③ control ビーズ未使用のため非特異反応に気づきにくいと思われる施設が認められた。

4. まとめ

各種操作，機器設定，マーカの再設定，精度管理について各施設が確認することで，より施設間差の少ない良好な結果が指せると考えられる。

第 24 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 69 施設のうち WAKFlow を実施した施設は 25 施設 (36.2%) であり、スクリーニング試薬 (SCR) が 13 施設、MR Class I が 17 施設、MR Class II が 8 施設、抗体同定用試薬 (HR) Class I は 18 施設、HR Class II は 17 施設であった。SCR もしくは MR でスクリーニング検査を行っている 24 施設中、2 施設が HR のみを抗体特異性同定試薬として使用しており、16 施設は HR+ 他法で抗体特異性の解析を行っていた。

2. 解析内容

施設間におけるコントロールビーズの Median 値の比較、各ビーズの反応に施設間差がないかを検証した。SCR と MR では、Median と Index、HR では Median と Calmed を比較して、判定結果に与える影響がないかを検証した。各施設の判定基準より、SCR および MR では抗体の有無、HR では抗体特異性について、判定結果を検証した。

3. 解析結果

1) WAKlow スクリーニング試薬 (SCR)

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
すべての施設で基準内であり、再検を必要とする施設は存在しなかった。

②各ビーズの反応

2 種類のロットが使用されており、Q24S2、Q24S3 ではビーズにより反応が異なっていた。S2433 の施設で Median が 2SD より低い傾向にあったが、BB 値が低いいため Index では高値を示していた。

③判定基準による結果

全施設で抗体有無の結果は一致しており、Q24S3 の Class II 抗体は陰性と判定された。ただし、Median<500 (陰性)、Index>1.5 (陽性) のビーズがあるため、カットオフ値の変更を検討し、抗体の有無を判定する必要があった。

2) 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

MR I では、全施設 BB<1,000 を満たしていたが、再検が推奨される BB<500 を満たしていない施設が多数存在した。MR II は全施設が再検基準内であった。

②各ビーズの反応

MR I で他施設と異なるロットを使用した S2416 は、Q24S2、Q24S3 にてビーズの反応が異なっていた。MR に添付されている 2 次抗体は IgG+IgM だが、IgG を使用した S2469 では Index が高値傾向であった。S2447 は、Q24S1 で Median、Index 共に低値傾向であったが、他の施設は Median が低値でも Index に影響はなかった。

③判定基準による結果

MR I はすべての施設が Q24S1-4 に対して抗体陽性の判定となるが、MR II では Q24S3 で結果の乖離を認めた。

3) WAKFlow 抗体同定用試薬：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

S2448 が HR I で BB が再検基準を超えていた。HR II では全施設が基準内であった。

②各ビーズの反応

HR I で異なるロットを使用した S2413 は、Median が 2SD を外れるビーズが複数存在した。S2448 の Median は、他施設が反応していないビーズも高値となりコンタミを

疑ったが、Calmedにすると低値でありBBも高値であったことから、コンタミではなく洗浄不良によりビーズのMedianが高値になったことが考えられた。

各施設のMedian値2,000–3,000以上で大きなばらつきを認めていたが、判定はScore6 (Calmed: 1,000) 以上を陽性とするため、結果への影響は少ないと考えられた。

③判定基準による結果

MedianとCalmedを比較すると、HR Iではビーズにより補正值が異なることから値が大きく乖離するものが複数存在したが、HR IIではMedianとCalmedに大きな差は認められなかった。エピトープを考慮すると、反応の弱いビーズが存在しCalmedが低くても陽性としたほうが良いと考えられる抗体特異性が存在した。HR IのQ24S1、HR IIのQ24S2では、Calmed値が1,000付近でばらつくため、施設により判定結果が異なることが考えられた。

4. まとめ

WAKFlow試薬のみで検査を行っているのは2施設であり、ほとんどの施設が他法を併用していた。血清処理の記載について、検査シートへの記載がない施設や正しく入力されていない施設が認められた。各施設で入力を確認するほか、入力シートの改善が必要と思われる。判定基準、カットオフ値が未記入の施設が多く存在した。

ソフトウェアの判定による場合でも、判定基準の入力は必要である。コントロールビーズが再検基準を満たしていない施設、「Sample Empty」や「High Back」が表示されていても再検していない施設が存在した。正しい結果を得るためには、再検基準に基づいた血清処理や再検が必要である。QCWSにおいて、正しく測定したデータを提出することが正確な検査結果を得ることにつながるため、正確なデータの提出が必要である。

抗体検出では、Class II抗体のQ24S3においてSCRは全施設の判定結果が陰性であったが、MRは1施設のみが陰性であり、他の施設では陽性反応を認めるビーズが存在したため、結果が乖離した。WAKFlowの操作法は解像度が異なる3つの試薬とも同じ方法であることから、SCRとMRの結果が乖離した原因として、ビーズに結合しているHLA抗原タンパク量や立体構造、2次抗体が異なることによるものと考えられた。HRの抗体特異性については、ロットにより反応の異なるビーズが存在し、判定結果に影響したことが考えられる。また、エピトープを考慮した抗体特異性の判定を行うことにより、同一エピトープでも反応の弱いビーズが認められた。エピトープを考慮して判定を行った場合、Calmed値が1,000以下であっても抗体特異性と判断したほうが安全な輸血・移植を行うことができると考えられる。

第 24 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—

成海 仁在¹⁾

¹⁾ 国立病院機構 宇多野病院 臨床検査科

1. 概要

抗体検査部門の参加施設 69 施設中 51 施設 (約 74%) が LABScreen を使用した。部門別では輸血関連が 29 施設、臓器移植が 34 施設、造血幹細胞移植は 36 施設、その他の部門での参加が 2 施設であった。(部門重複を含む)

使用試薬の内訳はスクリーニング試薬では LABScreen Mixed は 27 施設、LABScreen Multi が 1 施設、LABScreen PRA は 8 施設であり、LABScreen PRA を使用した施設がやや減少した。特異性同定検査試薬では LABScreen Single Antigen が 46 施設 (Class I のみ実施が 3 施設)、LABScreen Single Antigen Supplement は 19 施設であり、前回よりもやや減少した。

2. 解析結果

1) 内部精度管理ならびに使用試薬について

今回より各施設のキャリブレーション実施状況、コントロール測定状況を比較した。多くの施設がメーカー推奨基準を満たしていたが、未実施もしくは基準外の施設も見られた。内部精度管理の実施は正確な検査結果に必要であるため、メーカー推奨基準に沿った運用を検討して欲しい。また試薬ビーズ以外の検査試薬についても保存方法や期限に留意して、使用するように合わせて欲しい。

2) 血清前処理方法

血清前処理方法は各施設により未処理も含め、多種多様であったが、NC 値に大きな差異は見られなかった。QCWS 参考プロトコルでは凍結融解、超遠心が基本的な処理としてあるため、ほとんどの施設が処理を実施していたが一部未記入の施設もあった。実施した処理につ

いて検査状況シートへの記入の徹底をお願いしたい。なお、未実施の施設は QCWS 参考プロトコルの順守を合わせてお願いしたい。

3) LABScreen Mixed, Multi

(1) 陰性コントロール血清、各検体の Negative control Beads, positive control Beads

陰性コントロール血清の NC 値、PC 値はメーカー推奨の再検基準を満たさない施設はなく、良好な結果であったが、各検体の Negative control Beads, positive control Beads の値は施設間差が大きかった。

(2) 各検体の測定結果

各サンプルの測定結果は各 NC 値、PC 値と同じように施設間差が大きかったが、各施設基準の Cutoff 値 (NBG Ratio $\leq 1.5 \sim 9.1$) を使用した抗体有無一致率は Q24S1, Q24S2, Q24S3, Q24S4 で Class I, Class II ともに 100% であった。

4) LABScreen PRA

(1) 陰性コントロール血清、各検体の Negative control Beads, positive control Beads

陰性コントロール血清の NC 値、PC 値はメーカー推奨の再検基準を満たさない施設はなく、良好な結果であったが、各検体の Negative control Beads, positive control Beads の値は施設間差が大きかった。

(2) 各検体の測定結果

各サンプルの測定結果は各 NC 値、PC 値と同じように施設間差が大きかったが、各施設基準の Cutoff 値 (nMFI $\leq 500 \sim 1000$) を使用した抗体有無一致率は Q24S1, Q24S2, Q24S3, Q24S4 で Class I, Class II ともに 100% であった

5) LABScreen Single Antigen, Supplement, Explex

(1) Negative control serum、各検体の Negative control

serum, positive control serum

陰性コントロール血清のNC値、PC値はメーカー推奨の再検基準を満たさない施設はなく、良好な結果であった。各検体のNegative control Beads, positive control Beadsの値は施設間差が大きかったが、メーカー推奨の再検基準を満たさない施設はなく、良好な結果であった。

(2) 各検体の測定結果

各サンプルの抗体有無一致率はQ24S1, Q24S2においてClass I, Class IIともに100%であった。1施設のみ各サンプルの測定結果において他施設平均nMFIと大きく乖離したデータがあった。該当施設の各サンプル測定結果を入れ替えた再解析結果では他施設平均nMFIとの差が小さくなったため、サンプル取り違いが示唆された。また試薬ビーズカウントエラーを含んだデータがあった。

3. まとめ

LABScreenは抗体QC参加69施設中51施設(約74%)が使用しており、臨床にも数多く報告されている試薬である。解析結果では特異性同定検査試薬だけでなく、スクリーニング試薬においても各施設による様々なカットオフ値が見られたが、各サンプルにおける各検査試薬の抗体有無一致率は全て100%であり、良好な結果となった。一部施設ではメーカー推奨再検基準を満たさないデータも含まれたが、多くの施設が再検基準を満たす良好な測定データであった。良好な測定データを得るためには、内部精度管理の実施ならびに試薬管理にも留意しなければならないと考える。各施設においてはQCWS参考プロトコルに沿った検査手技の確認とともに検査状況の確認も合わせてお願いしたい。

第 24 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⁾

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

今回の参加施設合計は 7 施設、内訳は LIFECODES Life Screen Deluxe (LMX) 抗体スクリーニング: 6 施設, LIFECODES LSA Single Antigen (LSA): 6 施設であった。LIFECODES 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 24 回 QCWS 報告集をご参照いただきたい。

2. 解析項目

今回の参加施設では全ての施設において推奨洗浄方法であるフィルタープレート+吸引ポンプの使用やキット付属 2 次抗体 (IgG) を使用していた。検体前処理については QCWS 参考プロトコルには、10,000 g 30 秒の短時間遠心が記載されているが今回の参加施設では様々であった。LMX, LSA 試薬には NC 血清と PC 血清が試薬中に含まれており検査毎に使用することが推奨されている。よって LIFECODES では配布サンプルの他に NC 血清, PC 血清も解析対象としている。

具体的な解析項目は NC・PC ビーズ及び各試薬ビーズの施設間差, Luminex 装置の精度管理状況, 検体前処理の影響, 施設間のアレル判定において乖離を認めたビーズなどを解析した。

3. 解析結果

1) カットオフ値, 装置の精度管理及び検体前処理について

全ての施設において LMX, LSA 共にデフォルトカットオフ値を使用していた。装置の精度管理についても測定日当日もしくは 2 週間以内実施されていた。検体前処理では EDTA 添加 1 施設, 凍結融解+遠心処理 2 施設,

処理無 2 施設など様々であり, 他メーカーの試薬を併用して QCWS に参加している影響と考えられた。

2) LMX (抗体スクリーニング検査) について

LMX は添付文書中に Observed Ranges というアッセイの妥当性評価の目安となる値が LOT 毎に記載されている。各サンプルの PC, CON1 ~ CON3 (NC) ビーズの MFI 値は全て Observed Ranges の範囲内であった。

今回配布された 4 種類のサンプルについて, Q24S3 の Class I 判定で結果の乖離を認めた。LOT 間差, 前処理, バックグラウンドなどを比較したが乖離の要因は認めなかった。各施設から提出された RawValue を確認すると, 全体的に低値傾向であり, 数値が 10% 程度変化することで判定結果が変わることから, 低力価または低親和性の抗体の存在が示唆され検出限界付近のサンプルであったと推察された。

3) LSA (抗体特異性同定検査) について

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。今回の参加施設では全てプロトコル 2 で実施されていた。

PC ビーズでは全ての施設において十分な MFI 値を示し, 洗浄不良等が疑われる施設はなかったが, NC ビーズにおいて添付文書に記載されている Observed Limits を超える反応が観察された。Observed Limits はアッセイの目安であり必ずしも再検を必要とはしないが, 施設内部で対処方法などを決めておくことが望まれる。

施設間のアレル判定で乖離を認めたビーズは Q24S1 で 8 ビーズ (Class I : 3 ビーズ, Class II : 5 ビーズ), Q24S2 で 1 ビーズ (Class II ビーズ) であった。乖離したビーズに注目すると, MFI 値の平均は 400 ~ 1,200 の

間を示しておりカットオフ値付近に集中していた。

4. まとめ

LMX, LSA 参加全施設で共通のデフォルトカットオフ値を採用しており、判定の一致率は高かったと考えられる。

施設間判定に乖離を認めるサンプルがあったが、低 MFI 値を示すサンプルであり本試薬の検出限界付近だと

推察された。

検体前処理は各施設で様々な方法で実施されており、他メーカーの試薬を併用して QCWS に参加しているためと考えられた。複数の試薬を併用する施設においては、各試薬の添付文書を熟読し試薬の特徴を理解することが重要である。添付文書外の使用に関しては施設内でバリデーションの実施やメーカーに問い合わせのうえ使用されることが望まれる。

第 24 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 仮想クロスマッチ—

宮城 徹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

仮想クロスマッチは、ドナーの HLA 型とレシピエントの HLA 抗体特異性同定検査（以下、同定検査）の結果から、細胞を用いたクロスマッチの結果を予測するものである。過去の当ワークショップにおいて、ドナーのアレルが同定検査試薬に含まれない場合や、同じ抗原型でもアレルによって反応性が異なる場合の回答について施設間で違いが見られたが、判定基準の違いに起因するものだけでなく、回答方法の解釈の違いによるものも混在していた。また、仮想クロスマッチの目的についての理解不足も見受けられた。

そこで、今回は判定結果記入表を変更し、同定検査結果の回答欄でドナーアレルのビーズとその他に参考にしたビーズの反応性をそれぞれ記入する形式とするとともに抗原型による回答を廃止した。

さらに、総合判定の項目名を「ドナー細胞の反応予測」とすることで、仮想クロスマッチの目的を強調した。

加えて、分野（輸血関連、臓器移植、造血細胞）によって対象とする抗原や判定基準が異なることを想定し、どの分野として回答したかを記入するようになった。

2. 解析方法

回答内容について施設間で比較し、不一致があった場合には同定検査の結果等からその原因を解析した。

3. 結果と考察

1) タイピング結果

HLA タイピング結果はほぼ一致していた。使用したタイピング試薬の種類により、ambiguity の有無に違いがあった。

2) ドナーアレルのビーズの反応性

反応性の予測はおおむね一致していた。使用した試薬やカットオフ設定の違いに起因すると考えられる相違はなかった。C 抗原については多くの施設で ambiguity があったこともあって回答が分かれた（C*03:04/26 に対して、陰性 10 件、保留 1 件、判定不能 2 件、ビーズなし 5 件）。C*03:26 は日本人での頻度が低く、また、同アレルのビーズが同定試薬に含まれないことも、回答が分かれた原因であると考えられる。

3) ドナー細胞上の各抗原との反応予測

多くの施設がドナーアレルのビーズと同じ回答だった。一部施設で、ドナーアレル以外のビーズの反応を考慮して、予測を変えていた。

4) ドナー細胞の反応予測（総合判定）

クラス I は全 29 施設で一致した（陽性）。クラス II は、回答のあった 26 施設のうち、25 施設で一致し（陽性）、1 施設が不一致であった（陰性）。同定検査における検体の取り違えが不一致の原因と考えられた。

5) 判定記入表の変更について

今回の変更により、総合判定の根拠がより明確に示されるようになった。

回答方法に関する大きな混乱はなかったが、ホモ検体や α 鎖にも多型がある DP および DQ 抗原については回答方法にばらつきが見られた。また、複数の施設がタイピングを実施していない抗原の反応についてもハプロタイプを考慮して回答していたが、今回の変更でも回答欄は設けていなかったため、コメント欄での対応となった。

抗原型による回答の復活を要望する参加施設もあったが、HLA 抗体の反応はエピトープレベルで理解しようというのが世界的な方向性であり、そのためにはアレルレベルで解析する必要があることをご理解いただきたい

い。一方で、日常業務で実施していることを反映できる判定記入表であることも重要であると考えられる。

4. 今後の課題

1) 同一抗原型の別アレルの扱い

ドナーのアレルが試薬に含まれない場合の対応、および同一抗原型の別アレルで反応性が異なる場合の対応についてコンセンサスを形成していく必要がある。

2) 判定基準と試薬

施設によって同定検査の判定基準が異なることや試薬

の違いによる結果の乖離については、仮想クロスマッチにおける課題として挙げられてきている。今回の検体では問題とならなかったが、引き続きデータの蓄積を通じて対応について検討する必要がある。

3) 判定記入表

参加施設からの要望や回答方法にばらつきが見られた事例およびハプロタイプによる予測に対応できるように判定記入表をさらに改善することで、仮想クロスマッチに対する理解がより深まるとともに本質的な課題を浮き彫りにできると期待される。

第24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^{1,3)}, 佐藤 滋^{2,3)}

¹⁾ 福岡赤十字病院 移植センター 移植細胞研究課

²⁾ 秋田大学医学部附属病院 腎疾患先端医療センター

³⁾ 日本移植学会 移植関連検査委員会

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8回目となった。例年同様に全血サンプルとQCWSで使用する血清を用いてクロスマッチを実施する精度管理である。今回より、ABO血液型抗体価の精度管理を追加したが、ここでは詳細については割愛する。

2. 経過

参加施設は年々増加傾向で、昨年度より1施設増え、過去最高の48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14施設、血液センター3施設、検査センター3施設、試薬メーカー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後に東京より各施設に発送した。

当初、例年通り4月中旬に全血配布を予定していたが、コロナ感染第1波の最中であった為に、6月後半の配布延期となった。参加施設においては柔軟に対応頂きお礼を申し上げたい。

全血サンプル(ACD-A液)8ml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月初旬に集計結果を各施設にメールで配信、予定されていた学会大会(京都)は延期されたことに伴い、学会公式サイト上での解析報告となった。11月に開催された第56回日本移植学会総会(WEB)では録画形式にて解析報告を行った。また、令和3年2月に開催予定の第54回日本臨床腎移植学会(福島)においても報告予定

である。

3. 試料選択および検査方法

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、Q24S2を選択し、この抗体特異性(IgG)として、DRB1*15:02(nMFI=1,826), DRB3*01:01(nMFI=4,295), DQB1*06:01(nMFI=19,269)がドナー特異的抗体 Donor Specific Antibody; DSA となる想定であった。

検査方法は、FCXMが最も多く全体の7-8割の施設で実施され、CDCは4-5割程度、ICFAは3割であった。プロトコルに関しては、各施設での日常のプロトコルで実施して頂いた。各施設のプロトコルはアンケート調査を行いまとめたので、学会公式サイトを参照して頂きたい。

4. 結果

CDC, FCXMにおいては90%以上の高い一致率であったが、判定が全く異なる施設も散見された。ICFAにおいては、class II, DRにおいて一致率が低かった。

5. まとめ

多くの施設においては良好な結果であったが、一部の施設においては陰性と判定した施設を認めた。多くの場合、クロスマッチ検査は一度限りの検査であり、移植の可否に関わる重要な検査である。各施設において、内部精度管理に加え、外部精度管理に継続参加し精度維持に努めて頂きたい。

また、今年度より日本臓器移植ネットワークでは検査

センターと業務提携基本契約書を結び業務を行うことになった。その中で日本組織適合性学会のQCWS、全血クロスマッチ精度管理に参加し、結果を報告する事が記

載されており、次年度からは更に参加数が増加する事が予測されるが、柔軟に対応していきたいと考える。