

第26回 HLA-QC ワークショップレポート

第26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26回 QC ワークショップの参加施設(表1)数は、昨年と同数の85施設で、参加の内訳は、DNA-QCに74施設、抗体-QCに67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46施設であった(重複参加含む)。4月4日サンプルを配付、データ提出期限を5月31日として、その後解析を行い、9月19日にオンラインによるQCWSを開催した。終了後に収集したアンケート回答は過去最多の184件となり、今後の参考としたい。

2. 今回の QCWS のテーマと試料選定について

DNA 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 抗原型を正確に読み替えること、の3点であり、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。抗体サンプルの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。

3. 解析報告と担当者

解析報告と担当者については、この後の内容を参考とされたい。

4. QCWS 試料の総合結果について

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ており、表記は本学会の標準化委員会作成『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)』に従った。

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。

[#] 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

高 陽淑¹⁾、石塚 敏²⁾、黒田ゆかり³⁾、一戸辰夫⁴⁾、内田みゆき⁵⁾、奥平裕子⁶⁾、木村彰方⁷⁾、高橋大輔⁵⁾、中島文明⁶⁾、橋口裕樹⁸⁾、藤原孝記⁹⁾、宮崎 孔⁵⁾、湯沢賢治¹⁰⁾

¹⁾ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター、²⁾ 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室、³⁾ 日本赤十字社 九州ブロック血液センター、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 研究開発部、⁶⁾ 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、⁷⁾ 東京医科歯科大学、⁸⁾ 日本赤十字社 福岡赤十字病院、⁹⁾ 帝京大学 医学部附属病院 輸血部、¹⁰⁾ 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26回 HLA-QCWS 参加施設

1	JCHO中京病院	検査部	41	中四国ブロック血液センター	検査一課
2	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	42	熊本赤十字病院	検査部
3	大阪大学医学部附属病院	輸血部	43	鹿児島大学病院	輸血・細胞治療部
4	熊本大学病院	輸血・細胞治療部	44	香川県立中央病院	生化学免疫血清検査室
5	山形大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部	45	愛媛県立衛生環境研究所	衛生研究課 疫学情報科
6	福岡赤十字病院	移植センター	46	がん・感染症センター都立駒込病院	輸血・細胞治療科
7	東海大学医学部附属病院	臨床検査技術科輸血室	47	株式会社エスアールエル	遺伝子病理部 (ゲノム解析課)
8	北里大学病院	輸血部	48	東京大学医学部附属病院	輸血部
9	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部	49	山形県立中央病院	輸血部
10	金沢医科大学病院	北陸腎移植HLA検査センター	50	株式会社 医学生物学研究所	信頼性保証部 品質管理室
11	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	51	獨協医科大学病院	臨床検査センター
12	佐賀大学医学部附属病院	検査部	52	宮崎県立宮崎病院	輸血管理室
13	三重大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部	53	徳島大学病院	輸血・細胞治療部
14	札幌北楡病院	臨床検査技術科	54	日本赤十字社愛知医療センター名古屋第二病院	組織適合検査室
15	東京女子医科大学	中央検査部 移植関連検査室	55	医療法人鉄蕉会 亀田総合病院	血液分析・移植
16	ジェノタイプファーマ株式会社	ゲノム解析部門	56	藤田医科大学病院	輸血部
17	広島大学病院	輸血部	57	沖縄県立中部病院	検査科
18	国立病院機構 岡山医療センター	臨床検査科	58	JCHO仙台病院	検査部
19	株式会社ベリタス	技術グループ	59	弘前大学医学部附属病院	泌尿器科
20	高知医療センター	2階検体検査室	60	旭川医科大学病院	臨床検査・輸血部
21	株式会社 L S I メディエンス	遺伝子解析部 遺伝子検査グループ	61	東海北陸ブロック血液センター	品質部 検査三課
22	千葉大学医学部附属病院	輸血・細胞療法部	62	大阪急性期・総合医療センター	移植支援検査センター
23	日本赤十字社	血液事業本部 中央血液研究所 研究開発部 白血球チーム	63	富山大学附属病院	検査・輸血細胞治療部 輸血細胞治療部門
24	SUBARU健康保険組合太田記念病院	臨床検査部	64	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
25	札幌医科大学附属病院	検査部	65	湧永製薬株式会社	試薬・診断薬事業部
26	岡山大学病院	輸血部	66	市立札幌病院 検査部	輸血係
27	日本赤十字社 近畿ブロック血液センター	検査三課	67	関東甲信越ブロック血液センター埼玉製造所	品質部検査三課
28	米子医療センター	臨床検査科	68	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部
29	東京医科歯科大学病院	輸血・細胞治療センター	69	信州大学医学部附属病院	輸血部
30	公益財団法人HLA研究所	技術部検査課	70	愛知医科大学	腎移植外科
31	京都府立医科大学附属病院	輸血・細胞治療部 (腎移植センター)	71	北海道大学病院	検査・輸血部
32	帝京大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター	72	株式会社リプロセス	メディカル部臨床検査室
33	東邦大学医療センター大森病院	輸血部	73	県立広島病院	臨床研究検査科
34	大分県立病院	輸血部	74	宮崎大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部
35	日本赤十字社北海道ブロック血液センター	検査一課二係	75	日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター	検査部検査三課
36	株式会社 ビー・エム・エル	総研第三検査部 ゲノム検査課	76	琉球大学病院	輸血検査室
37	宇和島徳洲会病院	検査科	77	日本赤十字社東北ブロック血液センター	検査一課
38	東京医科大学八王子医療センター	採血室	78	関西医科大学附属病院	輸血・細胞療法部
39	長崎大学病院	細胞療法部	79	京都大学医学部附属病院	検査部輸血部門
40	九州大学病院	遺伝子・細胞療法部	80	公益財団法人 鷹揚郷腎研究所弘前病院	HLA検査室
			81	静岡県立総合病院	検査部

表2 第26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	
Q26D1	A*11:01:01	-	B*54:01:01	B*55:02:01	C*01:02:01	-
	A11	-	B54	B55	Cw1	-
Q26D2	A*26:01:01	A*31:01:02	B*40:01:02	B*40:02:01	C*03:04:01	-
	A26	A31	B60	B61	Cw10	-
Q26D3	A*02:01:01	A*24:02:01	B*15:428#	B*52:01:01	C*03:03:01	C*12:02:02
	A2	A24	B62	B52	Cw9	Cw12*
Q26D4	A*01:01:01	A*02:07:01	B*37:01:01	B*48:01:01	C*06:02:01	C*08:01:01
	A1	A2	B37	B48	Cw6	Cw8

HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
Q26D1	DRB1*04:05:01	DRB1*15:01:01	DQA1*03:03:01	DQA1*01:02:01	DPA1*01:03:01	DPA1*02:01:01
	DRB4*01:03:01	DRB5*01:01:01	DQB1*04:01:01	DQB1*06:02	DPB1*02:01	DPB1*09:01
	DR4	DR15	DQ4	DQ6	DPw2	DPw9
	DR53	DR51				
Q26D2	DRB1*04:06:01	DRB1*08:02:01	DQA1*03:01:01	-	DPA1*01:30	DPA1*02:02:02
	DRB4*01:03:01	-	DQB1*03:02	-	DPB1*02:01	DPB1*05:01
	DR4	DR8	DQ8	-	DPw2	DPw5
	DR53					
Q26D3	DRB1*04:05:01	DRB1*09:01:02	DQA1*03:02:01	DQA1*03:03:01	DPA1*02:02:02	-
	DRB4*01:03:01	DRB4*01:03:02	DQB1*03:03:02	DQB1*04:01:01	DPB1*05:01	-
	DR4	DR9	DQ9	DQ4	DPw5	-
	DR53	DR53				
Q26D4	DRB1*09:01:02	DRB1*10:01:01	DQA1*01:05:01	DQA1*03:02:01	DPA1*01:03:01	DPA1*02:02:02
	DRB4*01:03:02	-	DQB1*03:03:02	DQB1*05:01	DPB1*04:02	DPB1*05:01
	DR9	DR10	DQ9	DQ5	DPw4	DPw5
	DR53					

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
#Assigned:2017-04-30 Shiina T Frontiers in Immunology(2018)

表 3 第 26 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			
	Q26S1	Q26S2	Q26S3	Q26S4	Q26S1	Q26S2	Q26S3	Q26S4
Score 8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	20.3%
Score 4	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Score 1	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	79.7%

抗体特異性

<日本人集団におけるHLA遺伝子頻度0.1%以上の抗原に対する反応>

HLA Class	Antigen	Score	HLA Class	Antigen	Score
Q26S1	A1	1	Q26S2	A1	8
	A11	1		A2	8
	A2	1		A24	8
	A26	8		A3	8
	A3	4		A30	1
	A31	8		A33	8
	A33	8		B13	8
	B27	8		B27	8
	B37	1		B37	8
	B38	1		B38	8
	B39	1		B39	8
	B44	1		B44	8
	B46	1		B46	1
	B48	1		B48	1
	B51	1		B51	8
	B52	8		B52	8
	B54	8		B54	8
	B55	8		B55	8
	B56	8		B56	8
	B58	8		B58	8
B59	8	B59	8		
B60	1	B60	1		
B61	1	B61	1		
B62	1	B62	8		
B67	8	B67	8		
B71	1	B71	8		
B75	1	B75	4		
CW1	4	CW1	1		
CW10	1	CW10	1		
CW12*	1	CW12*	1		
CW14*	1	CW14*	1		
CW15*	1	CW15*	1		
CW4	1	CW4	1		
CW5	1	CW5	1		
CW6	1	CW6	1		
CW7	1	CW7	1		
CW8	1	CW8	1		
CW9	1	CW9	1		
DR1	8	DR1	1		
DR10	8	DR10	1		
DR11	8	DR11	1		
DR12	8	DR12	8		
DR13	1	DR13	8		
DR14	1	DR14	8		
DR15	8	DR15	1		
DR16	8	DR16	1		
DR17	1	DR17	8		
DR4	8	DR4	1		
DR51	8	DR51	1		
DR52	1	DR52	1		
DR53	1	DR53	1		
DR7	1	DR7	1		
DR8	8	DR8	8		
DQ2	8	DQ2	1		
DQ4	8	DQ4	8		
DQ5	8	DQ5	8		
DQ6	1	DQ6	8		
DQ7	1	DQ7	1		
DQ8	1	DQ8	1		
DR9	1	DR9	1		

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26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 HLA タイプと 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. 第26回 DNA-QC 細胞選定のポイント

本年度は仮想クロスの対象，施設間差の可能性，レアアレル，HLA 型への読替えの知識，ハプロタイプやエピトープの意識付け等を考慮し4検体を選定した。特に

エピトープの理解は HLA タイピングの結果を抗 HLA 抗体検査へとつなげるために重要と考え、今年度のテーマとした。

3. 配布試料について

選定した DNA は吸光度で 260/280 が 1.8 以上であること，インターカレーター法で 2 本鎖 DNA が十分にあること，電気泳動により断片化していないことを確認した。この DNA 試料 4 検体に SSO 法用に陰性コントロール (DNase free Water) 1 検体を加え 5 検体を配布試料とした。また例年通り DNA 試料は濃度非公開とした。

第 26 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 74 施設であった。部門別では臓器部門が 56 施設、輸血部門は 34 施設、造血部門は 39 施設、およびその他が 10 施設（重複有）の参加であった。方法別では SSO 法が 61 施設、SSP 法は 17 施設であり、SBT 法は 7 施設（重複有）に留まった。また SSP 法のほとんどは臓器部門の施設であった。評価対象遺伝子は、例年同様 HLA-A, -B, -C, -DRB1 とし、その他の HLA-DRB3, 4, 5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1 は評価対象外とした。

2. 総合評価結果

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うことが定められている。評価点の平均は 99.71 点を示した。判定 A の施設は、昨年度は 53.2% であったが今年度は 70.3% と大幅に増加し、良好な結果であった。特に判定結果の評価は 1 施設を除いて全ての施設が 60 点満点で非常に良好であった。結果表記の評価も平均が昨年度は 38.8 点であったが今年度は 39.7 点に上昇していた。検査技術の

向上と表記法への理解が進んだことが高評価につながったと考えられる。

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 3 施設、C は 1 施設であった。C であった 1 施設は SSO 法でプローブの反応不良による誤判定の施設である。

4. まとめ

昨年度からの課題である SSO 法でのコンタミネーション、根拠のないカットオフ変更は引き続きの課題であることが判明した（詳細は方法別解析を参照）。また表記ミスや反応不良による誤判定もまだ散見された。しかしながら、全体的には判定結果、結果表記両面で昨年度の 25 回 QCWS より改善傾向にあり、試験・検査状況も全ての方法において向上している。

さらなる検査精度向上のため、QCWS 解析集を定期的に確認し、日常検査に役立て、改善することが求められる。

第26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—

石本 倫子¹⁾

¹⁾ 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

1. 概要

昨年に比べ5施設少ない、18施設を対象にデータ解析を行った。このうち17施設は臓器移植部門のある施設であった。全施設でMicroSSP (One Lambda 社) が使用されており、MicroSSP JPN の使用が15施設、次いでMicroSSP ABDR が3施設であった。配付試料のDNA濃度を測定した施設は昨年の14施設(61%)と同程度の11施設(61%)であり、適宜希釈調製して検査されていた。

2. 解析方法

反応データ、アレル判定、結果の表記法について解析を行った。

3. 解析結果および考察

1) 反応データについて false negative, false positive および無反応を2施設で認めた。全て、エクセルシートへの入力ミスの可能性が考えられた。

2) アレル判定について DNA 型のミスアサインを1施設で認めた。反応パターンとHLA型には問題なかったこととDRB3/4/5ローカスであったことから、ハプロタイプを確認することでDRB1との連鎖を確認でき、ミスを防げた可能性があった。

3) 結果の表記法について

ア. 第1区域 1施設で推定アレルの組み合わせが漏れており表記ミスを認めたが、「第1区域にambiguityがある場合」の正答割合は昨年度の68%から今年度は

98%へ増加しており、全体的に理解が進んだと考えられた。

イ. 第2区域 解析ソフトにインポートしたファイルが適切でなかったと思われるものが1施設、早見表によるとと思われるものが2施設あった。

ウ. その他 (Null など) Nullアレルの「N」がもれている施設が1施設あり、原因は解析ソフト結果の読み替えミスと考えられた。JPNでは昨今のHLAアレル増大に伴いパソコンのスペックオーバーが生じ、最新の血清型ファイルでの解析が困難な状態が2年前から続いているため、C*03:23Nは解析ソフトでC*03:23と表示され、自施設で「C*03:23N」へ読み替えが必要となる。その他の表記ミス(CローカスのDNA型を「Cw」と表記、「*」もれ、カラム記載順など)もみられた。

4. まとめ

表記ミスにより1施設でDNA型のミスアサインを認めた。該当施設は原因の究明と対策が必要である。SSP法の結果は概ね良好であり、Nullアレルの表記ミスが昨年に比べ大幅に改善されていたことから、表記法の周知と理解が深まったと考えられた。

SSP法ではambiguityがあるため、複数の推定アレルを表記することとなる。表記ミスの改善には、表記法の理解、解析ソフトの設定確認、早見表使用時の解析ソフト併用などが必要であると考えられた。また、基本的なことではあるがダブルチェック等によりケアレスミスを防止することも大切である。

第26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) —

竹ノ内博之¹⁾

¹⁾ 宮崎大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部

1. 概要

LABType の参加状況は 74 参加施設中 8 施設 (10.8%) であり、昨年度より 1 施設の増であった。HLA-A,B,C,DR の参加内訳は、LABTypeXR が 4 施設、LABTypeCWD が 3 施設、LABTypeSSO が 1 施設であった。また、8 施設中 5 施設が LABTypeSSO での class II 測定を実施していた。

2. 解析方法

各施設から提出された結果入力シート報告及び測定データから、①判定結果とその表記法②解析ソフト (HLA Fusion) での解析内容③各 locus での陽性コントロールビーズ (PCB) の mMFI 値の解析 (平均とバラツキ; %CV) ④陰性コントロール検体 (Q26DC) 測定データからコンタミネーションの有無等の解析・評価を行った。

3. 解析結果および考察

各施設とも解析結果については概ね良好であったが、一部施設で結果の記載が学会の推奨するアレル表記と異なる記載をしている施設があった。

HLA Fusion での解析について、今回から結果入力シートに各施設で行った解析状況を記載しており、その記載内容から、適切な再検査の実施やビーズ情報の参照により、総合的に解析を実施している状況が確認できた。また、各 locus の解析集計から、サンプルにより

共通した false 反応を示すビーズがあった。特に DRB1 では false negative (FN) が出やすい傾向にあり、中でも Q26D3 では異なる試薬であっても共通した probe (Beads ID) で FN を認めていた。

各 locus での PBC の mMFI 値から、測定法毎に施設間のバラツキ (%CV) を比較したところ、何れの測定法でも平均が 20% を下回っており、また Q26DC 検体を用いたバックグラウンド解析結果でもコンタミネーションを認めたバッチ及び程度が減少していたことから、参加施設全体でみると検査技術の向上が伺えた。

4. まとめ

rSSO を原理とする LABType では、PCR による目的遺伝子の増幅、ハイブリダイゼーションによる増幅した標的配列への標識、専用解析ソフトを使用した測定データの解析、そして正しい結果表記と、知識と経験に裏打ちされた検査技術・解析技術が求められる。今回の QCWS では、例年よりも測定法・結果記載法共に安定していた。しかしながら、今回表記法や測定法上での難点を指摘された施設においては、学会やメーカーから発出される最新情報に常に注視すると共に、測定では既知の検体を測定バッチに加え結果を自己評価出来る方策の導入や、機器の適切なメンテナンスなど、日常検査での取り組みや手順についても検討していただきたい。最後に、試薬メーカーには特定アレルで認める false 反応などの情報発信やサポートを引き続きお願いしたい。

第 26 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) —

下北 希美¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

1. 概要

全 74 施設中 SSO(Luminex 法)での参加施設は 53 施設 (71%) であった。WAKFlow では LABType CWD の確認のために 1 サンプルのみ実施した施設を含め 49 施設 (66%), GenoSearch では 4 施設 (5%) となった。

2. 解析方法

- ・ 配布試料の DNA 濃度測定と濃度調整状況
- ・ 陰性コントロール (Q26DC) の測定状況
- ・ 陽性コントロールの平均値とばらつき
- ・ ビーズカウント
- ・ Pmin/Nmax 値の比率
- ・ カットオフ値変更と再検査の実施状況

以上 6 項目について解析を行った。

3. 解析結果および考察

配布試料の DNA 濃度を未測定の施設が 4 施設、濃度調整を未実施施設が 1 施設あり、その 5 施設では再検査もしくはカットオフ変更の割合が高かった。陰性コントロール測定状況では、12 施設でカットオフ値を超える反応を認めたが、昨年度より減少していた。Pmin/Nmax 比では、HLA-DRB1 において 3.0 以下を示す施設があった。メリハリのない不明瞭な検査データでは、弱反応やクロス反応により誤判定に繋がるため注意する必要がある。また、カットオフ値変更状況では HLA-DRB1 で FalsePositive の傾向にあったが、再検査の実施によりデータの改善が見られカットオフ値変更をした

施設が減少したと考えられる。また、すべてのローカスでカットオフ値変更を実施していた 1 施設では、再検査の実施、操作手技、機器の確認をしていただきたい。Q26D3 HLA-B において 1 プローブミスマッチで誤判定をした施設があった。Exon2 陽性コントロールがアンバランスな反応を示しており、B2_C2 コントロールと対応するプローブの蛍光値が低く、反応不良が示唆された。また、判定結果は正しく記載されていたが反応性に問題がある施設もあった。陽性コントロールの exon 毎のバランスや蛍光値、データ全体の反応性を確認することは、正しく反応しているかの指標になるため重要である。解析ソフトで自動判定ができていたとしても、測定データに疑いがある場合は再検査を実施し再現性の確認を推奨する。使用期限の切れた試薬を使用した 1 施設、SampleEmpty(ビーズカウントの少ない状態)で判定をした 2 施設では、正しい判定結果を導けないため、原因の特定や改善の必要がある。

4. まとめ

WAKFlow,GenoSearch ともに概ね良好な結果であった。陰性コントロールの陽性反応やカットオフ値変更をした施設が減少し、操作技術の向上が窺える。しかし、反応不良が疑われるデータで判定をした施設もあり、測定データをみて異常な反応に気付くことが重要である。すべての施設で陰性コントロールの陰性反応を示し、カットオフ値の変更や再検査の必要のない安定した技術習得を目指し、さらなる精度向上に期待したい。

第 26 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—

高田愼之介¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

1. 概要

参加状況は、全 74 施設中 Sanger 法は昨年より 1 施設減り 2 施設 (2.7%)、NGS 法は昨年度同様の 4 施設 (5.4%) であった。検査方法は、Sanger 法では 2 施設とも同じ機種シーケンサーを、検査試薬は SeCore と AlleleSEQR をそれぞれ用いられた。NGS 法で用いられたシーケンサーは、illumina 系が 2 機種、Ion 系が 1 機種であり、検査試薬は AllType NGS, AllType FASTplex, ScisGo HLA および自家調整試薬の 4 種類であった。NGS 法では試薬とシーケンサーの組み合わせパターンは 5 種類と多様で、同じ方法を用いた施設は 2 施設のみであった。

2. 解析方法

Sanger 法と NGS 法の判定結果をそれぞれ比較した。Sanger 法では Quality value (QV) と Noise/Signal (N/S) を、NGS 法では Sanger 法の 2 項目に加え、リードデプス、カバー率およびアレルバランスの確認を行い、同じ方法を用いた 2 施設については施設間差を確認した。

3. 解析結果および考察

Sanger 法の判定結果は、Q26D3 HLA-B のみ施設間で異なっていたものの、解析領域の違いや推定アレル一覧の未記載アレルによるもので、両施設とも適切な回答であった。また QV と N/S は概ね良好な値を認めたが、

一部の sequence data (HLA-B exon1 forward primer) で、読み始め直後の分離不良による QV の低下を認めた (QV \leq 20)。

NGS 法の判定結果は、2 施設で Q26D3 HLA-DRB4 の表記ミスがあったものの、それ以外は全ての方法で一致した。また QV は、サンプル間のデータ品質も同程度であり全施設で良好な結果であった。DRB1 のアレルバランスは他のローカスに比べ低い傾向にあったが、判定への影響は認められなかった。同じ方法を用いた 2 施設については、QV \geq 30 の割合と一部のローカスのタイピングリード数に差を認めたが、判定結果に影響するものではないと考えられた。

4. まとめ

Sanger 法は全てのサンプルで適切な判定結果であった。NGS 法は一部のローカスで表記ミスがあったものの、概ね適切な判定結果であった。表記ミスについては「HLA タイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則 (V-2-1)」を再度参照いただきたい。クオリティデータは Sanger 法、NGS 法ともに全施設のサンプル間で同程度の値であり、安定した手技の下で検査が行われたと推測する。本解析では判定に影響するようなシーケンスデータ (QV, depth, balance 等) を認めなかったが、今後とも十分にステータスを確認し判定することを推奨する。

第 26 回 HLA-QC ワークショップレポート — 試料説明 抗体 QC —

高橋 大輔¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

1. 使用する試料について

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。

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, -DP, DQ 座に対する抗体, IgM 性抗体, HLA 以外の非特異的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、過去の QCWS で使用履歴があるサンプルも含め、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. 第 26 回 抗体-QC 抗血清選定のポイント

適正な操作に基づき正確に検査できること、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を主眼とし試料を選定した。今回は前回同様に 4 サンプルを選定した。いずれも、明確な特異性を示す、過去に使用履歴があるといった特徴を基に選定した。抗体スクリーニングに加え、サンプル 1 と 2 は特異性解析の対象とし

た。仮想クロスマッチは、DNA-QC (Q26D1) と抗体 QC (Q26S1) をサンプルとして選定し、ドナーのタイピング結果 (アレルレベル) と同定試薬におけるドナーアレルビーズの反応と考慮すべきアレルビーズの反応を記入し、最終的に細胞との反応予想を回答する形式とした。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 (Q26S2) サンプルを選定し、配布されたヒト血液中の T 細胞、B 細胞と反応し得る抗血清を選定した。

3. 配布試料について

試料は、トロンビン処理後、窒化ソーダ (10%)、フェノール・レッド (1%) を加え、静置 (4°C /Over night) し、竹串でフィブリン塊を除去したのち、遠心 (2,000g/20min) とフィルター (ミリポア: Millex-GV SLGV 033 RS PVDF 0.22 μ m) により清浄化後、分注し各施設に配布した。

第26回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析 抗体QC—

高橋 大輔

日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

1. 概要

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8施設であり、全体の70%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35施設、臓器移植部門46施設、造血幹細胞移植部門36施設、その他4施設であった（重複あり）。総参加施設は67施設と昨年度から2施設減少したが、継続参加施設は62施設（92%）と高く、多くの施設が継続的に参加している状況であった。

2. 解析方法

抗体スクリーニングは、各施設から提出された総合判定結果を集計し、サンプルごとに一致率を算出した。抗体特異性同定については、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（現段階では0.67（2/3））し、抗原・アレルごとに判定一致率を算出した。

3. 解析結果および考察

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、Class Iは全施設で一致、Class IIではQ26S4以外は全施設で一致した結果であった（Q25S4: 79.7%）。Q26S4で認められた乖離は、カットオフ付近

の測定値の判断の違いが原因と考えられた。抗体特異性同定結果の一致率も高く良好な結果であったが、Q26S1で、HLA-A3, Cw1の一致率がそれぞれ50.9%、54.7%、Q25S2でHLA-B75の一致率が52.8%と一部の特異性でConsensus Resultが保留（0.67以下）であった。一致率の低かった抗体特異性の蛍光強度は、いずれも1,000程度の弱い反応性であり、施設によってその判断（解釈）が異なっているため生じたと考えられた。また、同一抗原でも試薬メーカーによって含まれるアレルが異なる場合や同一アレルでもメーカーによって反応性が異なる場合、あるいはSupplementビーズ使用の有無が最終判定の差異に繋がるケースが散見された。さらに、HLA-DQの判定において、 α 鎖の多型を加味するか否かで判定結果の差異が認められた。

4. まとめ

抗体スクリーニングや特異性同定試験は、ほとんどの施設で良好な結果であり、今後は内部・外部精度管理による検査精度の維持に注力すべきと考える。一方で、仮想クロスマッチの参加施設は、抗体特異性試験を実施した施設の60%程度にとどまっており、多くの施設の参加を期待したい。仮想クロスマッチに参加することで、DSA判定に必要な抗体検査結果の考え方について理解を深め、方法論横断的な知識や考え方を身につけていくべきと考える。

第26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—

前田 裕亮¹⁾

¹⁾ 九州大学病院

1. 概要

抗体-QC 参加 67 施設中、FlowPRA 参加施設は、Class I・Class II ともに 17 施設であった。参加部門（複数選択可）の内訳は輸血関連が 8 施設、臓器移植が 16 施設、造血幹細胞移植が 9 施設であり、他法との併用状況は、FlowPRA 法単独が 6 施設、LABScreen 法等と併用している施設が 11 施設であった。その他、参加施設の使用機器・試薬、血清処理方法、結果の判定方法、判定スコアについて集計した。

2. 解析方法

各施設を集計を行う上で、検査状況に問題があると思われる施設のピックアップを行った。さらに、各施設より提出された測定ファイルを QCWS 参考プロトコルに準じて再解析し、測定結果の報告値と再解析値の比較を行った。判定に問題があった施設については、その原因の精査を行った。

3. 解析結果および考察

血清処理は、QCWS 参考プロトコルにて遠心・凍結融解が必須条件として記載されているが、凍結融解を行っていないとみられる施設を 2 施設認めた。判定スコアの一致率は、Class I では Q26S1～S4 検体全て全施設陽性と判定し、スコア一致率は 100% であったが、Class II では Q26S4 検体のみ 2 施設が陽性、その他 15

施設が陰性と回答しており、一致率 100% とならなかった。測定結果の報告値と再解析値との比較は、判定スコア不一致となった施設を除き概ね一致していたが、解析を行う過程で機器設定（蛍光補正）が不十分な施設をいくつか認めた。スコア不一致となった 2 施設のうち、1 施設は再解析で陰性と判定できたため、主にマーカーの設定方法に問題があったことが考えられるが、もう 1 施設は再解析でも陽性にとれる結果であった。さらに、この施設では機器設定や判定基準等にも特に問題は見当たらなかったため、血清処理や検査手技で何らかの問題があった可能性が考えられる。

4. まとめ

Q26S4 検体の Class II のみ判定スコアの一致率が 100% とならなかったが、その他は一致率 100% であり、概ね良好な結果であった。したがって、判定不一致の原因として挙げられるマーカー設定方法や検査手技等を今一度見直すことで、より良好な結果が目指せると考えられる。特にマーカーの設定方法に関しては毎年 QCWS で指摘されている項目であるが、なかなか QC 参加施設での統一化には至っていない。今後は、QCWS 参考プロトコルのマーカー設定方法により明確な基準を設けるといったことも含めて、積極的に統一化のためのディスカッションをしていく必要がある。

第26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—

栗田 絵美¹⁾

¹⁾ 広島大学病院 診療支援部 臨床検査部門 輸血・細胞療法グループ

1. 概要

WAKFlow 参加施設は、昨年度と同様の 19 施設であった。抗体スクリーニングでは WAKFlow Screen (SCR) 8 施設, MR Class I 12 施設, Class II 4 施設であり, 抗体特異性同定では WAKFlow 特異性同定 (HR) Class I, Class II ともに 6 施設であった。参加部門の内訳は, 輸血関連 16 施設, 臓器移植 8 施設, 造血幹細胞移植 13 施設, その他 1 施設であった (重複あり)。

2. 解析方法

各検査試薬における蛍光ビーズの Median 値の 2SD を算出し, SCR 及び MR は Index 値, HR は Calmed 値の施設間差を検証した。SCR 及び MR では抗体の有無, HR では抗体特異性同定結果について判定一致率を確認し, 不一致の要因を解析した。

3. 解析結果および考察

SCR と HR の Median 値の施設間差はほとんど認められなかったが, 1 施設のみ他施設と比較して低値傾向であった。SCR は判定結果への影響はなかったが, HR では判定不一致の原因となっていたことが推察された。MR について, Median 値は試薬ロット間で大きなばらつきが認められ, Index 値は試薬ロットや血清前処理 (血清処理試薬による吸着の有無) やキット添付品以外の二次抗体の使用により変動がみられたが, 判定結果への影

響はなかった。SCR 及び MR の抗体有無の判定一致率は 100% と良好であった。抗体特異性同定の判定一致率も概ね良好であった。HR の Calmed 値が 2000 以上の高値および 500 以下の低値では良好な再現性が得られていたが, カットオフ付近で判定が分かれていた。不一致となった抗原は, Q26S1 では A3, B13, Cw10, DR14, DR51, DQ2 であり, Q26S2 では B54, B75, DR4, DR15, DQ5, DQ6 であった。不一致の要因として, カットオフ付近の反応による判定の解離, アレルに反応差があった場合の結果解釈の差異, DQ の α 鎖の反応性を加味しスコア (4) と判定, HR の試薬特性による差異が考えられた。

4. まとめ

WAKFlow 参加施設の抗体スクリーニング及び抗体特異性同定の判定一致率は, 例年に引き続き概ね良好であった。抗体特異性同定の不一致の一部には, 結果の記載ミスと思われるケースが認められたため注意が必要である。Median 値が低値であった施設において, 洗浄操作不良, 二次抗体の分注不良や希釈ミス, 測定機器のメンテナンス不足などの原因が考えられるため, 操作手順や環境の再確認をお願いしたい。HR の Calmed 値がカットオフ付近の場合やクロスマッチの結果と矛盾が生じた場合は, 再検査の実施や他法との併用などを検討し総合的に判断することが重要と考える。

第26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—

伊藤 誠¹⁾

¹⁾ 北海道大学病院

1. 概要

抗体-QC 参加 67 施設中 LABScreen 参加施設は 54 施設であった。使用試薬の内訳は、抗体検出では LABScreen Mixed は 33 施設、LABScreen Multi は 1 施設、LABScreen PRA は 8 施設、抗体特異性では LABScreen Single Antigen Class I は 49 施設、Class II は 46 施設、LABScreen Single Antigen Supplement / ExPlex Class I は 22 施設、Class II は 21 施設であった。参加部門の内訳は、輸血 27 施設、臓器移植 36 施設、造血幹細胞移植 29 施設、その他 3 施設であった。

2. 解析方法

LABScreen 各検査試薬の各施設で用いられているカットオフ値の比較を行った。抗体検出では LABScreen 各検査試薬における判定一致率を算出し、判定結果が不一致となった要因について解析を行った。抗体特異性では、LABScreen Single Antigen における抗原別判定一致率が 90% 未満となった要因について解析を行った。

3. 解析結果および考察

【LABScreen Mixed】各施設で用いられているカットオフ値は NBG ratio:1.5 ~ 6.0 であった。Q26S4 Class II を除く Q26S1, Q26S2, Q26S3, Q26S4 Class I において判定一致率 100% となった。Q26S4 Class II の判定結

果が不一致となった一因として、各施設のカットオフ値の違いが考えられた。

【LABScreen PRA】各施設で用いられているカットオフ値は nMFI:500 ~ 1000 および自動判定であった。Q26S1 ~ Q26S4 において、判定一致率 100% となった。

【LABScreen Single Antigen】各施設で用いられているカットオフ値は nMFI:500 ~ 2000 および自動判定であった。抗原別判定一致率が 90% 未満となった要因として、各施設設定のカットオフ値付近の nMFI、アレルによる反応性の違い、Supplement / ExPlex 使用の有無が考えられた。

4. まとめ

抗体検出、抗体特異性ともに概ね良好な結果であったが、LABScreen Mixed において Q26S2 と Q26S3 の検体取違いをした可能性のある施設があった。また、LABScreen Mixed と LABScreen Single Antigen において、NBG ratio や nMFI が他の施設と大きく乖離している施設があった。これらの施設においては、QCWS 参考プロトコル等を参照し、測定ステップの見直しをしていただきたい。

LABScreen Mixed では各施設のカットオフ値の違い、LABScreen Single Antigen ではアレルによる反応性の違いの解釈、Supplement / ExPlex 使用の有無によって、施設間の総合判定の差異に繋がっていた。

第26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—

中野 学¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 北海道ブロック血液センター

1. 概要

抗体 QC 参加 67 施設中、33 施設が参加した。各施設で実施した HLA 抗体特異性同定検査結果とタイピング結果で仮想クロスマッチを実施し、判定を行った。33 施設がクラス I 陽性、28 施設がクラス II 陽性と判定した。クラス I の判定結果は一致したが、クラス II では一部の施設が保留や判定不能と判断した。またクラス I では参加したものの、クラス II では参加しなかった施設が 5 施設あった。

2. 解析方法

参加施設は自施設で実施した HLA 抗体特異性同定検査結果と DNA タイピング結果から仮想クロスマッチを実施した。クラス I は A, B, Cw ローカス、クラス II は DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQ, DP を解析対象とした。特異性同定検査の評価に蛍光強度 (nMFI) を用いて各施設の基準に従って判定をした。

3. 解析結果および考察

A ローカスの判定結果は陰性であり概ね一致していた。一部の施設では A*11:01 を陽性と判定しており、特異性同定試薬の nMFI は 1,000 を超えていたが、全施設の平均 +2SD を上回っていた。C ローカスは特異性同定試薬の nMFI を 1,000 で判定していると考えられる施設が多く、nMFI は 1,000 前後であったことから

判定結果は 2 つに分かれた。クラス II では DRB3/4/5 で DNA タイピングと仮想タイピングを実施した施設があった。抗体特異性は DR51 のアレルの一つである DRB5*02:02 が陽性であったため、仮想タイピングを DRB5*01:01/02:02 と判定した施設と抗原型のタイピング結果を DR51 と判定した施設は陽性としていた。一方で、陰性アレルも存在するため仮想タイピング結果を考慮すると判定不能と回答した施設もあった。DNA タイピング結果は DRB5*01:01 であったため、DNA タイピングを実施した施設は陰性と判定していた。DQ と DP は判定結果が乖離した施設はなかった。抗体特異性同定検査結果が全施設の平均から逸脱してしまうことや、アレル違いによる抗体特異性が検出された場合の対応が各施設で異なることによって仮想クロスマッチの結果が乖離してしまうケースがあった。

4. まとめ

仮想タイピング結果は概ね全施設で一致した。クラス I は DNA タイピングを実施しているため、B*55:02 の反応性が不明で B*55:01 の反応性のみ検出されても施設間の判定結果には大きな影響を受けなかった。一方で、仮想タイピングの実施が多かったローカスではアレル違いの特異性が検出されると判定結果は様々であった。クラス II の QC に参加している施設は積極的な仮想クロスマッチへの参加を期待したい。

第26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⁾ 医療法人楽山会 せいてつ記念病院

³⁾ 日本移植学会 移植関連検査委員会

1. 概要

今回、46施設からの参加があり例年とほぼ同じ参加数であった。参加施設内訳は、臓器移植ネットワークの検査施設が23施設、移植関連病院が17施設、血液センター2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。全血サンプル（ACD-A液）8mlは、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月に集計結果を各施設にメールで送信し、第30回日本組織適合性学会大会（WEB）でのライブ配信で報告となった。同様に10月に開催された第58回日本移植学会総会（名古屋）でも報告を行った。今後は令和5年2月に開催予定の第56回日本臨床腎移植学会（ハイブリッド）において報告予定である。

2. 試料説明

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Q26S2を選択し、抗体特異性内はB*51:01 (9,146), B*52:01 (7,365), DRB1*14:03 (6,199), DQB1*06:01 (10,539)

がドナー特異的抗体 Donor Specific Antibody ; DSA となる想定であった。（ ）の数値は試料選定時の nMFI を示す。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。各参加施設のプロトコルはアンケート調査を行い纏めたので参照して頂きたい。

3. 結果

CDC は全施設において陽性で一致した結果であった。FCXM は1施設のFCXM-Bを除き陽性で一致した結果であった。ICFA においては多くの施設で Class II 陰性と判定し、CDC や FCXM との結果の乖離を認めた。

4. まとめ

今回、サンプル選定として強陽性になる組み合わせを準備し、多くの施設においては良好な結果であった。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。