

第28回 HLA-QC ワークショップレポート

第28回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過および QCWS 試料の選定について—

高 陽淑¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター
一般社団法人日本組織適合性学会精度管理委員会[#]

1. ワークショップの経過

第28回 QC ワークショップの参加施設(表1)数は、一昨年と同じ85施設で、参加の内訳は、DNA-QCに77施設、抗体-QCに63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45施設であった(重複参加含む)。4月8日にサンプルを配付、データ提出期限を6月8日として、その後解析を行い、9月28日に数年ぶりの参集のみによるQCWSを開催した。

また、今回から結果の報告様式について、グーグルフォームを利用した方法に変更した。

変更による大きな混乱はなかったが、測定ファイルのアップロード完了の確認方法や、回答の簡略化など今後のブラッシュアップが必要である。

QCWS集会参加後アンケートについては、昨年よりやや減少したものの127件の回答があり、複数の建設的なご意見や要望を頂くことができた。今後の参考とした。

2. 今回の QCWS のテーマと試料選定について

DNA-QC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結果の表記法に

ついて理解すること、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点であり、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、②CREGやエピトープなどの知識を基に正確な抗体特異性解析ができること、の2点である。これらのテーマに基づき選定されたサンプルのうち、DNAおよび抗体部門から仮想クロスマッチ対象を、抗体部門からは移植学会連携全血クロスマッチ対象のサンプルを、厳選している。

3. 解析報告と担当者については、この後に続く内容で把握されたい。

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、表記については、本学会の精度管理委員会作成『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。

[#] 一般社団法人日本組織適合性学会 精度管理委員会

高 陽淑¹⁾、石塚 敏²⁾、高橋大輔³⁾、石本倫子⁴⁾、内田みゆき⁵⁾、大橋順⁵⁾、金本人美⁶⁾、木村彰方⁷⁾、黒田ゆかり⁸⁾、清水まり恵³⁾、田中秀則⁹⁾、西川晃平¹⁰⁾、前島理恵子¹¹⁾、村田 誠¹²⁾

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、³⁾ 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所、⁴⁾ 高知医療センター、

⁵⁾ 東京大学、⁶⁾ 日本赤十字社福岡赤十字病院、⁷⁾ 東京医科歯科大学、⁸⁾ 日本赤十字社九州ブロック血液センター、⁹⁾ 公益財団法人HLA研究所、

¹⁰⁾ 三重大学、¹¹⁾ 帝京大学医学部附属病院、¹²⁾ 滋賀医科大学

表 1 第 28 回 HLA-QCWS 参加施設

		(受付順)	
九州大学病院	遺伝子・細胞療法部	43 大阪大学医学部附属病院	輸血部
京都府立医科大学附属病院	輸血・細胞医療部	44 長崎大学病院	細胞療法部
NHO米子医療センター	臨床検査科	45 株式会社 ビー・エム・エル	総研第三検査部 ゲノム検査2課
大阪公立大学医学部附属病院	輸血部	46 徳島大学病院	輸血・細胞治療部
藤田医科大学病院	輸血部	47 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
熊本大学病院	輸血・細胞治療部	48 広島大学病院	輸血部
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	49 JCHO中京病院	検査部
公益財団法人 鷹揚郷腎研究所弘前病院	HLA検査室	50 北里大学病院	輸血部
東邦大学医療センター大森病院	輸血部	51 株式会社医学生物学研究所	伊那研究所 第二生産棟 品質管理室
東京女子医科大学	中央検査部 移植関連検査室	52 公益財団法人HLA研究所	技術部検査課
ジェノタイプファーマ株式会社	HLA部門 HLA検査課	53 がん・感染症センター都立駒込病院	輸血・細胞治療科
札幌北楡病院	臨床検査技術科	54 大阪急性期・総合医療センター	移植支援検査センター
東京医科大学八王子医療センター	中央検査部 輸血検査室	55 獨協医科大学病院	臨床検査センター 遺伝子・HLA検査室
三重大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部	56 東京医科歯科大学病院	輸血・細胞治療センター
佐賀大学医学部附属病院	検査部	57 自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部
株式会社ベリタス	技術グループ	58 岡山大学病院	輸血部
株式会社リプロセル	メディカル部	59 伊勢赤十字病院	医療技術部臨床検査課輸血検査室
金沢医科大学病院	北陸腎移植HLA検査センター	60 信州大学医学部附属病院	輸血部
鹿児島大学病院	輸血・細胞治療部	61 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
福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	62 旭川医科大学病院	臨床検査・輸血部
東京大学医学部附属病院	輸血部	63 国立循環器病研究センター	臨床検査部 輸血管理室
千葉大学医学部附属病院	輸血細胞療法部	64 昭和大学病院	地下2階 輸血センター
岡山医療センター	臨床検査科	65 高知医療センター	2階検体検査室
静岡県立総合病院	検査部 血液管理室	66 株式会社 エスアールエル	遺伝子・ゲノム解析課 DNA解析課
東海大学医学部附属病院	臨床検査技術科 輸血室	67 日本赤十字社	血液事業本部 中央血液研究所
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	68 岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部 輸血検査室
福岡赤十字病院	移植センター	69 弘前大学病院	泌尿器科
宮崎大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部	70 松江赤十字病院	検査部 輸血管理室
医療法人鉄蕉会 亀田総合病院	臨床検査室	71 宮崎県立宮崎病院	臨床検査科輸血管理室
香川県立中央病院	中央検査部	72 山形大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部
札幌医科大学附属病院	検査部	73 日本赤十字社 九州ブロック血液センター	品質部 検査一課
大分県立病院	輸血部	74 株式会社HGLA	花十字ジェネティクラボ
京都大学医学部附属病院	検査部 輸血部門	75 国立病院機構長崎医療センター	臨床検査科輸血管理室
帝京大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター	76 関西医科大学附属病院	輸血・細胞療法部
湧永製薬株式会社	試薬・診断薬事業部	77 東北大学病院	輸血・細胞治療部
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	78 愛媛県立衛生環境研究所	疫学情報科
JCHO仙台病院	検査部	79 琉球大学病院	検査・輸血部 輸血検査室
北海道大学病院	検査・輸血部	80 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
市立札幌病院	検査部検体検査課HLA検査担当係	81 熊本赤十字病院	検査部
日本赤十字社近畿ブロック血液センター	検査三課	82 関東甲信越ブロック血液センター	検査部 検査三課
県立広島病院	臨床研究検査科	83 富山大学附属病院	検査・輸血細胞治療部

第 28 回 HLA-QC ワークショップレポート — 試料説明 DNA-QC —

内田みゆき¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社血液事業本部研究開発部

1. 使用する試料について

DNA-QC の試料として、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 4 種類の試料を選定した。

2. 第 28 回 DNA-QC 細胞選定のポイント

日常遭遇する可能性があるレベルの低頻度アレルを選

択し、稀なタイプを判定できることを目的とした。また、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 型の読み替えの知識を課題とした。

3. 配布試料について

濃度非公開の DNA 試料 4 検体に SSO 法用の陰性コントロール (DNase free Water) 1 検体を加え 5 検体を配布試料とした。

第 28 回 HLA-QC ワークショップレポート — 試料説明 抗体-QC —

内田みゆき¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社血液事業本部研究開発部

1. 使用する試料について

抗体-QC の試料として、日本組織適合性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、目的に応じた 4 種類を選択した。従来からの要件として、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ことがあげられる。その中から、過去の QCWS で使用履歴があるサンプルも含め、抗血清の特異性を考慮して選定を行った。

2. 第 28 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、従来通り 4 サンプルを選定した。選定時には、Q28S1、S2、S4 は HLA class I & II ともに陽性、S3 は HLA class I のみ陽性であり、いずれも明確な特異性を示していた。抗体スクリーニングに加え、S1 と S2 は特

異性解析の対象とした。仮想クロスマッチは、DNA-QC (Q28D1) と抗体 QC (Q28S1) 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 液添加のヒト血液中の T 細胞、B 細胞と反応し得る抗体 QC (Q28S2) をサンプルとして選定した。

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℃ /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28回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析（表記含む） DNA-QC—

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

DNA-QCの参加施設数は77施設であった。部門別では臓器移植部門が57施設、輸血部門32施設、造血幹細胞移植部門41施設、その他10施設（重複有）であった。方法別ではSSO法が65施設、SSP法は18施設、SBT法は8施設（重複有）であった。またSSP法の多くは臓器移植部門の施設であった。今回、試料Q28D1に新規アレルDRB1*11:01V、試料Q28D3にレアアレルDPA1*01:30が検出され、検査法や使用試薬によって推奨回答のアレルが異なっていた。反応不良または表記ミスによるミスアサインを4施設で認めた。SSO法での陰性コントロール測定は全施設で実施されていた。

2. 評価結果

評価基準で定義されている評価は、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＝評価A、60点以上100点未満＝評価B、60点未満＝評価Cの三段階で総合評価を行うことが定められている。評価対象遺伝子は、HLA-A、-B、-C、-DRB1とし、その他のHLA-DRB3、4、5、-DQA1、-DQB1、-DPA1、-DPB1は評価対象外とされている。

1) 判定結果の評価は、60点満点が69施設、平均は前回と同様の59.8点であった。2) 結果表記の評価は、40点満点が66施設、平均は39.9点で前回より0.3点上昇していた。表記ミスは軽微なものが多く、ダブルチェックにより防ぐことができると考えられた。1)判定結果と2)

結果表記を合わせた「HLAタイピング結果評価点」は、平均99.7点であった。100点満点を示す「評価A」の施設は、前回58.7%（41施設）に比べ今回は83.1%（64施設）と増加し、表記ミスの改善によるものと考えられた。

3. 試験・検査状況の評価

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評価は5施設で、C評価の施設はなかった。B評価の施設は、不備内容の確認と原因究明及び必要に応じた対策を行うことで改善に繋がると考えられた。

4. まとめ

これまでの課題であったSSO法での陰性コントロール測定は全施設で実施され達成できていたが、他の課題は未達成であり引き続き観察が必要と考えられた。ミスアサインについては、臨床へ影響を及ぼしかねないためゼロに近づける必要がある。配布試料の選定理由であるアレルの読み替えと低頻度アレルの検出については、全施設で達成できており良好であった。QCWSは、自施設における検査の正確性の確認および必要に応じて検査環境や手順を見直すきっかけとなる貴重な機会である。各施設においてQCWS解析報告を確認して振り返りを行い、日常検査に役立てられることを期待したい。

第 28 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—

湯石 晃一¹⁾

¹⁾ 獨協医科大学病院 臨床検査センター

1. 概要

昨年と同様の 18 施設を対象にデータ解析を行った。MicroSSP (One Lambda 社) の使用状況は、昨年と同様となり 15 施設で MicroSSP JPN, 3 施設で MicroSSP ABDR が使用されていた。これら 18 施設中 3 施設において rSSO 法が併用されていた。また、配付サンプルの DNA 濃度を測定した施設は、昨年の 10 施設から 3 施設増え 13 施設となった。希釈調製したサンプルで検査をしていた施設は 8 施設となり、このうち 1 施設では DNA 濃度測定が未実施であった。

2. 解析方法

2024 年度版推定アレル一覧表に基づき、判定ソフト Fusion と判定ワークシートを用いて各施設から提出された 1) 反応パターン, 2) アレル判定, 3) 結果の表記法について解析, 評価を行った。

3. 解析結果および考察

1) 反応パターンについて 提出された反応パターンをもとに再判定を行い、その結果と提出された判定結果を比較解析したところ、2 施設で他施設と異なる反応パターンが報告されていた。このうち 1 施設 1 サンプルで false negative を認め、残る 1 施設 2 サンプルでデータ提出時における転記ミス疑いを認めた。反応パターンの転記ミス防止策としては、判定ソフト Fusion に入力した反応パターンの Export 機能を活用する事が挙げられる。

2) アレル判定について DNA 型のミスアサインを 4 施設で認めた。このうち 1 施設は false negative によるミスアサインを 1 サンプルで認め、3 施設では判

定の組み合わせ見逃しによるミスアサインを認めた。そして後者の 3 施設のうち 1 施設では判定ソフト Fusion が未使用となっていた。

3) 結果の表記法について 結果の表記ミスを 11 施設で認めた。このうち 1 施設では DNA 型表記ではなく HLA 型表記を用いた報告がされており、また他の 1 施設では 2023 年度版推定アレル一覧表の使用疑いによる表記ミスを認めた。残る 9 施設においては「:」や「/」、「+」もれなどの判定結果入力ミスや表記法の確認不足による表記ミスを認めた。表記法の確認不足の中には「HLA タイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則」に記載された「Ⅰ HLA 表記の基本」や「Ⅲ アレルの表記」、「Ⅴ カラム (セル) への表記」に関する内容で確認不足を認めた。

4. まとめ

配付試料の DNA 濃度測定を実施した施設は増加し 13 施設になったが、サンプル濃度を未確認のまま希釈調整を実施した施設があった。PCR 反応に使用する核酸の濃度や純度は反応パターンに直接影響するため確認を怠らないことが大切と考える。判定ソフト Fusion を使用しても判定に見逃しが発生した施設が散見された。MicroSSP の判定には複数の組み合わせが発生する事もある。ミスアサインを防ぐためには判定ワークシートを活用し最新の推定アレル一覧表に記載される全てのアレルについての確認をすることも有効と考える。SSP 法におけるミスの要因は多岐にわたるため、手順を改めて確認することが、ケアレスミス防止に役立つと考える。

第 28 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 LABType—

吉田 雅弥¹⁾

¹⁾ 熊本赤十字病院 検査部

1. 概要

LABType の参加状況は 77 施設中、昨年度と同様の 11 施設 (14.3%) であった。HLA-A, B, C, DR の参加内訳も昨年度と同様、LABType XR で 7 施設、LABType CWD で 3 施設、LABType SSO で 1 施設であった。また、LABType SSO を用いた HLA-DQA1/DQB1 は昨年度より 1 施設減り 5 施設、HLA-DPA1/DPB1 も昨年度より 1 施設減り 3 施設の参加であった。

2. 解析方法

各施設から提出された測定データは解析ソフト (HLA Fusion) に取り込み、結果入力シート報告の内容とあわせて、① DNA タイピングが適正な操作過程に基づき正確に行えているか、② タイピング結果が正しく表記できているかを確認した。

3. 解析結果および考察

Q28D1 HLA-DRB1 で 1 施設がビーズの反応不良による False negative 及び手技の影響と思われる False positive で誤判定となった。反応不良のビーズについては、同じ試薬 (LABType XR) を使用している 7 施設全てで反応が弱い傾向にあり、ビーズの特性と思われる。Q28D3 HLA-DRB1 で 1 施設が解析ソフトの自動判定を採用し、誤判定となった。同じ試薬 (LABType CWD) を使用している 3 施設と比較し、False positive となったビーズと False negative となったビーズを認めた。False positive となったビーズについては陰性コ

ントロール (Q28DC) でも反応しており、コンタミネーションが疑われた。False negative となったビーズについては、反応不良と思われた。再検査の実施やビーズの反応性確認、陰性コントロールのデータ確認で誤判定を防ぐことができたかと推察する。False positive, False negative を認めた施設は手技、機器、試薬、検査環境について見直してほしい。

表記法については、null アレル表記の理解不足、ホモ接合で 1 つのアレルのみ検出された場合 (ホモ接合と判定された場合) の「- (ハイフン)」表記漏れ、ambiguity 頻度順の表記ができていない施設があった。「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)」を確認し、理解を深めてほしい。

4. まとめ

コンタミネーションや手技の影響による False positive が散見された。陰性コントロールを測定し、測定データを確認することが重要である。また、日常検査でも陰性コントロールと検体の測定データを比較してコンタミネーションの有無確認や False positive, False negative が出やすいビーズの把握を意識してほしい。手技や環境の影響を受けやすい検査であるため、手技の安定化や使用する器具・備品の清掃も心がけてほしい。

QCWS は施設間比較ができる貴重な機会であるため、解析報告を活用し、自施設の検査精度の向上、表記法を含めた知識や技術の習得に役立ててほしい。

第28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 WAKFlow, GenoSearch—

鈴木 友菜¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 東北ブロック血液センター

1. 概要

WAKFlow での参加状況は昨年度と同じ46施設(59.7%)であり、GenoSearchは過去5年増減なく4施設(5.2%)となった。WAKFlowでの参加施設も近年ほぼ増減はなく同程度の参加数の推移となっている。一部表記ミスがみられた施設もあったが、誤判定をした施設は無かった。

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配布試料のDNA濃度測定と濃度調整状況②陰性コントロール(Q28DC)の平均値とばらつき③陽性コントロールの平均値とばらつき④ビーズカウント⑤Pmin/Nmax値の比率⑥カットオフ値変更と再検査の実施状況の6項目について解析を行った。

3. 解析結果および考察

参加施設50施設のうち、DNA濃度測定を行った施設は49施設であり、1施設が濃度未測定であった。濃度測定実施施設49施設のうち、DNA濃度希釈を実施していたのは48施設であり、ほとんどの施設で濃度測定と試薬にあった濃度調整が行われていた。陰性コントロール(Q28DC)については、5施設でカットオフを越える反応が見られた。他のサンプルと同様の反応パターンがみられる施設があり、コンタミネーションの可能性が示唆された。陰性コントロールが陽性反応を示した施設数は年々減少傾向であり、良好な結果であるといえる。ビーズカウントの解析においても、いずれの施設もSample Emptyはなく、良好な結果であり、Pmin/Nmax比ではほとんどの施設で3.0以上であった。再検査実施施設

は6施設であり、いずれもWAKFlowで参加している施設であった。カットオフ変更実施施設もWAKFlowで参加している施設のみであり、4施設がカットオフを変更して判定を行っていた。反応不良により、カットオフ値を下げて判定していた施設では、陽性コントロールビーズの蛍光値が低く、カットオフ以下であったプローブ以外のプローブも全体的に反応性が低かった。陽性コントロールビーズの反応性が不良である際には、誤判定のリスクにもなるため、再検査の実施を推奨する。また、カットオフは越えていないものの、Median値がカットオフ値±10%以内の施設も複数あったため、解析ソフトで判定が出ていたとしても、測定データ・判定結果に疑いがある場合は再検査を実施し再現性の確認が必要であると考えられる。

4. まとめ

WAKFlow, Genosearchともに概ね良好な結果であった。一部の施設では、陰性コントロールにおいて陽性反応がみられた施設もあり、コンタミネーションが疑われるため、手技及び検査環境の見直しを推奨する。判定結果においては誤判定施設もなく、良好な結果であったが、一部表記ミスがみられた。記号のミスや空白表記忘れなど軽微なミスではあったが、正確な検査結果の報告のためにも、入念な見直しが必要である。例年と比較して、参加施設の検査精度の向上がうかがえるような結果であり、今後さらなる検査精度の向上が期待できるため、各施設のDNAタイピング検査の精度管理の一助として、QCWSへの継続的な参加をお願いしたい。

第 28 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 – Sanger, NGS—

木野 佑亮¹⁾

¹⁾ 公益財団法人 HLA 研究所

1. 概要

SBT 法の参加状況は、全 77 施設中 Sanger 法では昨年度同様 2 施設 (2.6%)、NGS 法では 6 施設 (7.8%) と参考データ扱いではあるものの昨年よりも 1 施設増加という状況であった。検査方法として、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 がそれぞれ用いられた。NGS 法で用いられたシーケンサーは、Miseq (Illumina)、IonS5 (ThermoFisher) であり、検査試薬は AllType NGS, AllType FASTplex, ScisGo HLA の 3 種類 (参考データ除く) であった。

2. 解析方法

試薬キット、測定機器の組合せが多様であるため、解析は個々の精度確認を主体とした。Sanger 法では DNA 濃度と Quality Value (Quality Score) 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った。

3. 解析結果および考察

Sanger 法の判定結果は 2 施設共に適切なアレル判定結果であったが、一部表記法に則っていない内容があった。Quality Value では、 $QV \leq 20$ の結果が散見された。読み始めの分離不良など Sanger 法特有の現象は仕方ないが、分離不良が見られたプライマーの結果は原因の考察が必要と考える。試薬の状況、DNA テンプレートとプライマーの濃度の再確認や、塩や不純物の混入、再検

査も視野に考慮し、試薬の不良であれば、メーカーへ打診することも必要であると考ええる。

NGS 法では、アレル判定結果については解析結果に問題は無いと判断されるものの、表記法に則って結果を記載できていない施設が確認された。特に情報量の多い NGS 法の解析結果を正しく伝えるためにも表記法の理解が必要と考える。Quality Score, 総リード数など、各施設サンプル間での偏りは少なく、安定したライブラリー調整、測定機器の状態を保つメンテナンスが実施されていることが伺えた。リードデプス、カバー率、アレルバランスについても大きな問題となるデータは無く、アレル判定への影響は低いものと考えられる。

4. まとめ

Sanger 法、NGS 法共にアレル判定結果は一致しているものの、表記ミスが数件認められた。新規アレルやレアアレルを出力できていても、正しい結果の表記ができていなければ結果の持つ意味を伝達できない。表記については「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)」を今一度確認することを推奨する。

昨年度に引き続き、本解析では判定結果に影響するようなシーケンスデータは認められなかった。原理、原則の理解はもちろんの事、出力された種々のデータにおける精度管理を実施することで結果への信頼度を確認できると考える。QCWS の参加を通して、より深い検査法、表記法への理解を願う。

第 28 回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析 抗体 QC—

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

今年度の抗体 QC は、施設情報非公開であった 1 施設を除外して、病院・大学に属する施設 46 施設、血液センター 9 施設、検査センター・企業 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 30 施設、臓器移植部門 43 施設、造血幹細胞移植部門 38 施設、その他 7 施設であった（重複あり）。総参加施設は 63 施設と昨年度から 3 施設減少したが、全施設が継続参加施設であり、ほとんど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と定義（現段階では 0.67 (2/3)）し、抗原・アレル毎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 Q28S3 以外は全施設で一致した結果であった。不一致を認めた Q28S3 血清は、LS-Mixed を使用した一部の施設で陽性と判定していた。Q28S3 の測定値は陰性であったことから、記載ミスが原因と考えられた。抗体特異性同定結

果では、Q28S1 で、HLA-B62 の一致率が 52.8%、Q28S2 で HLA-A1, A24, B37, B55, B58, B67, Cw4, DR13, DQ5, DQ6 の一致率がそれぞれ 67.9%, 49%, 60.4%, 71.7%, 73.6%, 75.5%, 77.4%, 74%, 84%, 84% と一部の特異性で Consensus Result が保留（0.67 以下）であったものの、全体的な一致率は良好であった。一致率の低かった抗体特異性の蛍光強度は、Q28S1 の B62 において 1,000 程度の弱い反応性であった。一方で、Q28S2 は同一抗原のアレル間に蛍光強度の明確な差を認めた。これは使用試薬やメーカーによって対応しているアレルに違いがあるためと考えられた。使用試薬の差や複数試薬を使用して判定していることが最終判定の差異に繋がるケースもあった。

4. まとめ

今回、一部の抗血清のスクリーニング結果が異なっていた。これは記載ミスが原因であると考えられたため、対象施設は慎重に検査結果を記載していただきたい。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、今後は判定結果の解釈が重要となってくると考えられる。仮想クロスマッチの参加施設数は 32 施設であったが、判定結果の解釈は臨床に正確な情報伝達に繋がるため、仮想クロスマッチ参加施設数のさらなる増加を期待したい。

第 28 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 FlowPRA —

蓮輪 亮介¹⁾

¹⁾ 大阪公立大学医学部附属病院

1. 概要

FlowPRA の参加施設は、Class I・Class II ともに 13 施設であり、昨年度より 2 施設減少した。参加部門（重複あり）の内訳は、輸血関連が 6 施設、臓器移植関連が 12 施設、造血幹細胞移植関連が 7 施設、企業が 2 施設であった。FlowPRA 単独での参加は 3 施設、他法併用での参加は 10 施設であった。測定機器は、Beckman Coulter が 6 施設、Becton Dickinson and Company が 7 施設で使用されていた。

2. 解析方法

各施設の血清処理、試薬ロットおよび使用期限、判定基準、判定スコア、%PRA などを確認した。また、添付の FlowPRA 画像を基に、各施設のヒストグラムの形状やマーカー設定位置を確認した。さらに、Kaluza 解析用ソフトウェアを使用し、「QCWS 参考プロトコル 抗 HLA 抗体検査 (FlowPRA™) 2024 年度版」に従って測定データの再解析を実施した。

3. 解析結果

血清処理について、QCWS 参考プロトコルでは遠心および凍結融解が必須処理となっているが、凍結融解の記載がない施設が 2 施設確認された。

試薬に関しては、ビーズや二次抗体の使用期限は守られていたが、PC 血清について期限切れロットを使用していると考えられる施設が 2 施設、記載間違いと考えられる施設が 1 施設確認された。

判定スコアについては、Class I・Class II ともに全

検体で判定スコアの一致率は 100% であった。結果の判断基準は全施設で %PRA だけでなくヒストグラムの波形も考慮されていた。一方で、マーカー M1 の設定が NC 血清のヒストグラムの裾位置より右側に設定される傾向のある施設が 2 施設、左側に設定される傾向のある施設が 1 施設確認された。また、洗浄不十分による二次抗体の反応不良で %PRA が低値となっていると考えられる施設が 1 施設確認された。

マーカー M2 を設定して判定している施設は少なく、多くの施設では全検体で M1 のみを用いて判定していた。これは NC のピークと明確に重なる結果がなかったことによるものと考えられる。また、再解析でも M1 と M2 による %PRA の大きな分離は確認されなかった。

蛍光補正 (Compensation) は概ね良好だったが、一部施設で微調整が必要と判断された。測定時のビーズカウントでは、メーカー推奨のカウント値に満たない施設が複数あり、設定の見直しが必要と考えられる。

4. まとめ

Class I・Class II ともに、全検体で判定スコアの一致率は 100% であり、良好な結果であった。

報告値と再解析値の %PRA は概ね一致していたが、一部で乖離が見られた。この原因として、M1 の裾位置やマーカーの設定方法の違いが考えられる。各施設が操作手順や機器設定、マーカー設定を再確認することで、施設間の差をさらに縮小し、より良好な結果が得られると考えられる。

第28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 WAKFlow —

増田 英敏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

抗体-QC 参加 63 施設中 WAKFlow 参加施設は 19 施設であり、スクリーニング試薬 (SCR) が 8 施設、MR Class I が 12 施設、Class II が 4 施設、特異性同定試薬 (HR) は Class I・Class II とともに 6 施設であった。参加部門の内訳は、輸血関連 13 施設、臓器移植 8 施設、造血幹細胞移植 14 施設であった (重複あり)。

2. 解析方法

参加施設の血清処理方法、測定条件、判定基準等を集計した。また、各検査試薬におけるコントロールビーズの施設間差、各ビーズの Median 値の $\pm 2SD$ 、SCR および MR の各ビーズの Index 値と CV%，HR は Calmed 値の施設間差を検証した。SCR および 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

【WAKFlow SCR】

抗体有無の判定結果は全施設で一致していた。全サンプルで Median・Index 値ともに高値傾向がみられる施設があったが、試薬ロット間差の可能性が考えられた。また、全体的に BB 値が低い傾向となっており、Q28S3 の Class II において全施設で Index 値 2.0 以上のビーズが認められたが、Median 値は全て 750 未満で判定結果は陰性となっていた。

【WAKFlow MR】

抗体有無の判定結果は全施設で一致していた。Class I で試薬ロット間差と推測される Median・Index 値の差異が認められたが、結果への影響はみられなかった。また、Median・Index 値ともに高値傾向を示す施設があったが、測定条件等のデータからは高値の要因となるような他施設との相違はみられなかった。

【WAKFlow HR】

Median・Calmed 値ともに大きな外れ値は無く、抗原別判定結果の一致率も良好であった。判定不一致の主な要因としては、試薬特性の差異、カットオフ付近の反応、アレル反応性に対する判断基準の相違等が考えられた。

4. まとめ

WAKFlow 参加施設の抗体有無およ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。ロット間差と思われる反応性の強弱や一部高値傾向がみられる施設はあったが、総合的に判定結果に影響があるような明らかな外れ値は認められなかった。各試薬共通してデータが収束されてきていることから試験手技、測定装置の管理が高い水準になっていると考えられた。また、アレル反応性抗体の判定は悩ましいが CREG やエピトープ等を考慮することで合理的な判定ができると考えられる。

第28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 LABScreen—

伊藤 誠¹⁾

¹⁾ 北海道大学病院

1. 概要

抗体-QC参加63施設中LABScreen参加施設は53施設であった。使用試薬の内訳は、抗体検出ではLABScreen Mixedは31施設、LABScreen Multiは1施設、LABScreen PRAは7施設、抗体特異性ではLABScreen Single Antigen Class Iは45施設、Class IIは42施設、LABScreen Single Antigen Supplement / ExPlex Class Iは25施設、Class IIは25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た。抗体特異性では、LABScreen Single Antigenにおける抗原別判定一致率が67%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:1.5～9.1であった。Q28S3 Class IIの判定一致率は91%であり、一部の施設では設定したカットオフ値(NBG ratio:1.5)以上となり、陽性と判定された。Q28S1、Q28S2、Q28S3 Class I、Q28S4では、

判定一致率100%となった。Q28S3 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。Q28S1、Q28S2、Q28S4、Q28S4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Rxn6であった。抗原別判定一致率が67%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、Supplement / ExPlex使用の有無、アレルにより反応性が異なる場合の抗原別判定の考え方の違いが考えられた。

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。LABScreen Single Antigenでは各施設設定のカットオフ値付近のnMFI、Supplement / ExPlex使用の有無、アレルにより反応性が異なる場合の抗原別判定の考え方の違いによって、施設間の総合判定の差異に繋がっていた。

第 28 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—

高橋 大輔¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所中

1. 概要

QC 参加 63 施設中のうち仮想クロスマッチ参加施設は 32 施設であった。各施設で実施された HLA 抗体特異性同定検査および DNA タイピング結果を基に仮想クロスマッチを実施し、32 施設がクラス I 陽性、27 施設がクラス II 陽性と判定し、全施設で一致していた。ただし、ローカス別解析では、クラス I の C ローカスおよびクラス II の DRB345 で一部に不一致を認めた。

2. 解析方法

解析対象はクラス I が A, B, C ローカス、クラス II が DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQ, DP ローカスとし、施設間の一致率および不一致の原因について調査を行った。以下に主なローカス別の結果を示す。

3. 解析結果および考察

A ローカス：対応アレルは A*11:01 および A*26:01 であり、いずれも蛍光強度が低値を示していたため、全施設で陰性と判定されていた。B ローカス：対応アレルは B*39:01 および B*56:01 であり、いずれも高い蛍光強度を示したことから、全施設で陽性と一致する判定が得られていた。C ローカス：対応アレルは C*04:01 および C*07:02 であり、平均蛍光強度が 300 前後と低値であったことから、多くの施設が陰性と判定していた。一方で、一部の施設では 1,000 を超える蛍光強度を示しており、陽性または判定不能とされていた。DRB1：対応

アレルは DRB1*11:01 および DRB1*14:05 であり、いずれも高い蛍光強度を示しており、全施設で陽性と判定されていた。DRB1*11:01 は、NGS 解析により新規アレル (DRB1*11:01V) の存在が示唆されたため、新規アレルに対する抗体反応性を検討した。エプレット解析の結果、被検血清中の抗 DR 抗体は 149 番目のヒスチジン (149H) を認識すると推定された。一方、当該アレルで検出されたアミノ酸変異 (165L) は、このエプレットから 30Å 以上離れており、抗体反応性への影響は無視できると判断された。したがって、DRB1*11:01V に対する抗体反応性は既存の DRB1*11:01 と同等であると推測される。DRB345：対応アレルは DRB3*02:02 であり、蛍光強度の平均が 1,000 付近であったため、スコア判定に施設間でばらつきが見られていた。1,000 未満の蛍光強度を示した施設ではスコア 1, 1,000 以上を示した施設ではスコア 8 と判定していた。一部施設ではタイピング未実施のため未回答であったが、DRB345 は連鎖不平衡から推定可能であるため、積極的な参加が望まれる。

4. まとめ

今回の仮想クロスマッチ結果は概ね全施設で一致しており、各施設の解析精度および信頼性が高いことが確認された。一方で、微弱な反応については、施設間の反応性の差の解消に務めるとともに、施設における判断基準を明確に規定することが重要と考える。

第28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—

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

今年で12回目となる全血クロスマッチは、今回44施設からの参加があり例年とほぼ変わりはない。参加施設内訳は、臓器移植ネットワークの検査施設が25施設、移植関連病院が13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、数日後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32回日本組織適合性学会大会(愛知県)で報告、同様に9月に開催された第60回日本移植学会総会(長崎県)でも報告を行った。今後は令和7年2月に開催予定の第58回日本臨床腎移植学会(広島県)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た。レシピエント(血清)はQ28S2を選択し、A*02:01(10,540), A*02:06(9,968), C*07:02(3,887), DRB1*15:02(15,108), DRB5*01:02(2,751), DQB1*06:01(21,756)等がドナー特異的抗体 Donor Specific Antibody ; DSA となるサンプルを選定した。()の数値は試料選定時のnMFIを示

す。検査方法は、昨年と同様にFCXMが最も多く全体の7~8割の施設で実施され、CDCは5割程度、ICFAは2割であった。方法ごとの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。

3. 結果

方法別でみると、今回CDC-Tが一致率57%と前回と比較して低かった。CDC-Bは全施設陽性の100%だった。FCXMにおいては、2施設がFCXM-Tを陰性、FCXM-Bは1施設が陰性と判定していた。ICFAはClass I, II共に80%~90%の一致率だった。

4. まとめ

今回、CDC-TにおいてはnMFI10,000以上のDSAで結果が陰性と陽性に分かれ一致率が低い結果だった。原因の一つとしてプロトコルの違い、陽性判定基準が施設によって異なっていることが考えられる。また日本移植学会医療標準化・移植関連検査委員会では、CDCの結果報告には判定と死細胞(%)の両方を記載することを提言したいと考えている。検査側は結果報告にあたり、結果解釈時に臨床医の混乱を招くことがないように努めることも重要である。今後も内部精度管理のみならず外部精度管理にも継続参加をしていただければと思う。