

4 確認検査

確認検査では、患者／ドナーは各々以下の項目について検査を実施します。

検査項目	患者	ドナー	備考
NGS-SBT法 ^(注1) HLA検査 (11座) [A,B,C,DRB1,DRB3/4/5,DQA1,DQB1,DPA1,DPB1]	必須	オプション	
一般血液検査	—	必須	
蛍光ビーズ法 ^(注2) HLA検査 (HLA-A,B,C,DRB1)	—	必須	4座 (A, B, C, DRB1座) のアレルが判明していないドナーが対象

注1: 確定アレル

NGS-SBT法は、現在もっとも精度の高いHLAタイピング法です。検査結果はHLAアレル全領域(エクソン、イントロン、非翻訳領域)の遺伝子配列情報に基づく「確定アレル」として、第3区域(例:HLA-B*35:01:01)あるいは第4区域までのアレル名(例:HLA-A*24:02:01:01)で報告されます。ただし、NGS-SBT法でも、第2区域までしか確定できない場合や、確定アレルを決定できないこともあります。

注2: 推定アレル

蛍光ビーズ法では「確定アレル」を決定することができないため、検査結果は「推定アレル」として第2区域のアレル名(例:HLA-B*40:02)で報告されます。「推定アレル」とは、HLA分子の多型性が集中する領域の遺伝子配列の情報から日本人でもっとも検出されやすいアレルを推測したものです。

< 補足 >

HLA分子のアミノ酸配列は第2区域までのタイピング結果により決定されており、患者とドナー候補者のHLAアレルの適合性は、確定アレルの第2区域までの一致・不一致により正確な判定が可能です。第2区域が一致している場合、第3区域・第4区域の不一致が移植成績に与える影響は現時点では明らかにされておりません。

HLAアレルのPコード表記については、以下URLで確認できます。

http://hla.alleles.org/alleles/p_groups.html

抗原結合ドメインのアミノ酸配列が同じグループをPグループ(またはPコード)と呼びます。

稀なアレルが検出された場合、同じPグループ内の推定アレルに置き換えてドナー検索することが可能です。

例: B*15:102の場合、B*15:01に置き換え

尚、Pグループ(またはPコード)については、P.46~47もご参考ください。

1. 患者HLA確認検査(NGS-SBT法)実施の手続き

患者登録後は、正確なHLAタイピング結果に基づいてドナー検索を行うため、患者HLA確認検査を(株)SRLへ予約の上、できる限り速やかに実施してください。患者HLA確認検査を行うことにより、登録時のタイピングエラーを修正することも可能となります。

1-1. 検査予約

登録申請手続き後、患者HLA確認検査の「確認検査予約票」を登録医師にFAXします。

原則、採血1週間前までに、必ず電話とFAX(両方)で下記へ予約してください。SRLから採血管が送付されます。

⇒ 採血から9~20日ほどでNGS-SBT法によるHLAタイピング結果を報告します。

< 患者HLA確認検査 予約連絡先 >

SRL 骨髄バンク担当窓口

TEL:042-586-4440 / FAX:042-586-4413

- ・必ず骨髄バンクからFAXした確認検査予約票をお使いください。この予約票を用いないと、骨髄バンク専用の取り扱いにはならず、検査料金やデータ報告の方法が異なり遅延につながります。
- ・登録施設以外で採血を実施する場合は、予約票の「採血管お届け先」を修正してご使用ください。

1-2. 検査項目

NGS-SBT法によるHLAタイピングでは、HLA-A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1の11座を測定、報告します。

※ドナー検索に用いるのは、HLA-A, B, C, DRB1の4座です。

※予約票にある検査項目を変更する場合は、必ず移植調整部にもご連絡ください。

1-3. 患者HLA確認検査の省略が可能なケース

患者登録時に指定の検査機関(※1)でNGS-SBT法検査済みであれば、患者HLA確認検査を省略できます。ただし、本人確認検査(※2)は必要です。

※1:(株)エスアールエル、(公財)HLA研究所、ジェノダイブファーマ(株)

※2: 検体の取り違い等がないことを確認するため、蛍光ビーズ法でHLA-A, Bを検査し、一致を確認する検査。
NGS-SBT法検査とは別日に採血したHLAデータ(HLA-A,B)があれば、本人確認検査も省略可能です。
その場合は、移植調整部までお知らせください。

・患者HLA確認検査を省略可能な場合も検査項目「(ブランク)」で予約票がFAXされます。その場合は、SRLへの予約(電話とFAX)は不要ですのでご注意ください。

1-4. HLA検査用の検体に伴う注意事項

化学療法中の場合や白血球が少ない場合は、以下をご参照いただき、適切な検体の提出にご配慮ください。

(1)口腔粘膜での検査について(DNA抽出のための追加料金が必要)

移植歴がある場合、また、重症造血不全症の患者さんや抗がん剤を用いた化学療法中の患者さんで、白血球が少ない等の理由により、確認検査実施が困難な場合には、末梢血以外の体細胞(口腔粘膜等)での実施も可能です。
SRLへの予約時にその旨をお伝えください。

※移植歴がある場合、口腔粘膜採取時に血液が混入するとドナーとレシピエントの混在型となり、判定できないことがあります。
血液が混入しないようご注意ください。

※口腔粘膜採取用のスワブは2本送付されますので、適切な方法で採取の上、必ず2本提出してください。

(2)採血タイミングについて

患者が化学療法中の場合

- ・投薬前/後でも、白血球細胞が安定している時期など臨床状態が最適な時期に採血していただくことが重要です。
- ・血液中の白血球数(WBC)が1000個/ μ L以上ある場合は、7 mL採血管を1本ご提出いただくことで検査可能です。
- ・採血量でご不明の場合は、直接SRL 骨髄バンク担当窓口(TEL 042-586-4440)までご相談ください。

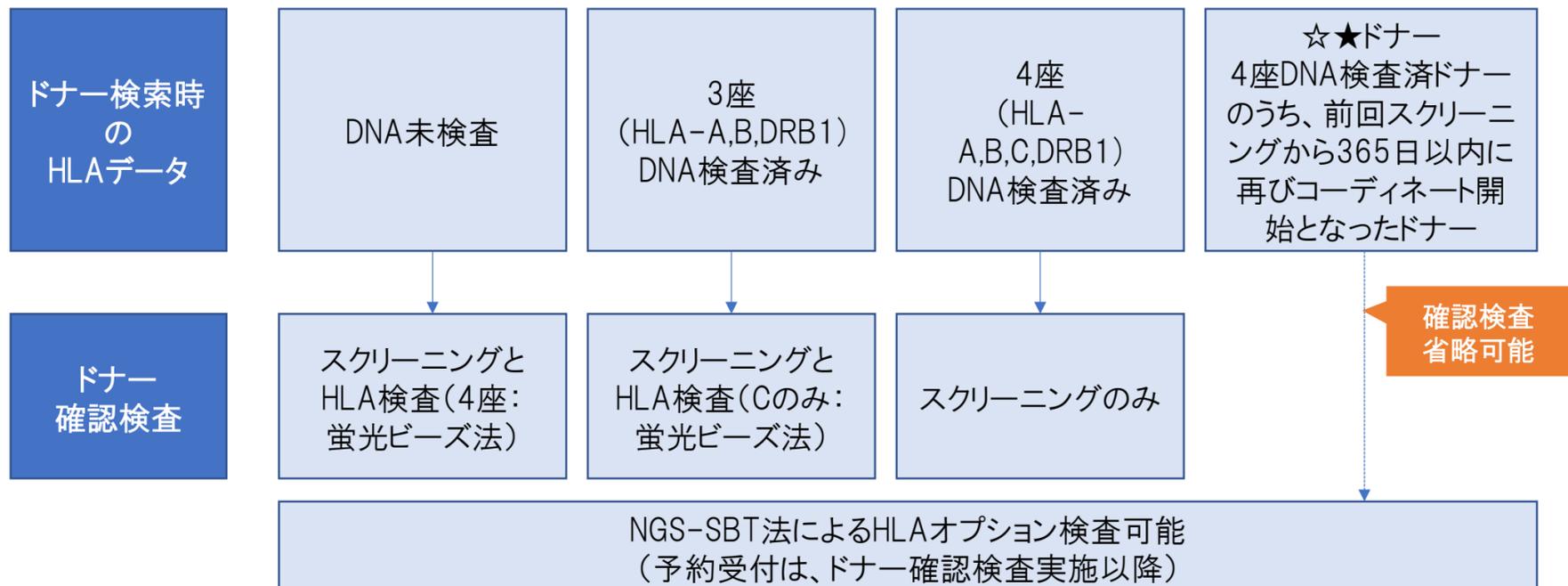
(3)検査料について

検査の結果、判定不能/特定不能となった場合にも検査料金が発生します。
さらに再検査を実施する場合は、追加の検査料金が必要です。

2. ドナー確認検査

2-1. ドナー確認検査項目

ドナーが検索された時点で保持しているHLAデータによって、ドナー確認検査で必要な検査が異なります。



2-2. NGS-SBT法によるドナーHLAオプション検査について

ドナー確認検査の段階におけるHLA検査は「蛍光ビーズ法」で実施されており、「推定アレル」として報告されています。「推定アレル」とは、HLA分子の多型性が集中する領域の遺伝子配列の情報から日本人でもっとも検出されやすいアレルを推定したものです。「推定アレル」の結果を解釈する際には、以下の点にご留意ください。

- ① ドナー登録者の「推定アレル」はあくまでも被検者が日本人であると仮定した場合に予想される型です。
- ② ドナー登録者の国籍は確認していません。
- ③ 日本人であっても稀なアレルを保有している場合など登録されている「推定アレル」と実際のアレルが異なることがあります。
- ④ NGS-SBT法を実施した結果、ドナーがNullアレルを保有していることが判明する可能性があります。Nullアレルとは、細胞表面に発現しない遺伝子変異を有するHLAアレルで、アレル名の最後にNの文字をつけて表記されます。例えば、HLA-A*02:15Nは多型領域に対応するエクソン2とエクソン3の遺伝子配列はHLA-A*02:07と同一ですが、エクソン4にストップコドンとなる変異があるため、細胞表面に発現するHLAタンパクを作ることができません。
- ⑤ 「推定アレル」で患者と適合と判定されたドナーのアレルが実際にはNullアレルであった場合、その組み合わせはGVHD方向のHLA不適合を生じることに留意が必要です。

患者HLA確認検査におけるHLAタイピングの対象は、NGS-SBT法で行うため、HLA-A, B, C, DRB1の4座以外に、DRB3/4/5、DQA1、DQB1、DPA1、DPB1を含めた11座であるのに対し、ドナーの「推定アレル」によるタイピングの対象はHLA-A, B, C, DRB1の4座のみとなります。ドナー候補者の「確定アレル」によるHLAタイピングの情報が必要な場合には、NGS-SBT法によるドナーHLAオプション検査(有料)を実施してください。

当法人は、提供を依頼するドナー（1位選定ドナー）のNGS-SBT法検査実施を推奨します。

特に、以下のような場合には、オプション検査を行うことが勧められます。

- * HLAアレル不適合ドナーを選定する場合
- * 患者がHLA-DR3/4/5 (-DR52/53/51)、-DQ, -DPに対する抗HLA抗体を保有している場合
- * 患者あるいはドナーが日本人には頻度の低いHLAハプロタイプを保有していることが推定される場合
- * より厳密に患者とドナーのHLA適合性を評価することが望ましいと考えられる場合

なお、HLAアレルの表記法・タイピング結果の報告法については、以下の資料もご参照ください。

日本組織適合性学会 HLA 標準化委員会:
「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)2版(pdf)」
<https://jshi.smooosy.atlas.jp/ja/Allele>

日本赤十字社HLA委員会・日本造血細胞移植学会
「造血細胞移植のためのHLAガイドブック」(2019年5月10日公開)
第1部 I. HLA分子の構造と機能・評価法
第1部 III. HLAタイピングの原理と検査結果の解釈
https://www.jmdp.or.jp/medical/familydoctor/hla_reference.html

<造血幹細胞移植に関する主治医相談窓口>

主治医からの造血幹細胞移植に関する相談に対し、当法人医療委員会やHLAに関する専門家等に意見を聞くことができます。回答は1週間前後を目処にお返しします。あくまでも参考意見であることをご理解いただき、最終的には担当医師がご判断ください。

 / 医師の方へ / 患者主治医の方へ / 造血幹細胞移植に関する主治医相談窓口
https://www.jmdp.or.jp/medical/familydoctor/hla_adviser.html

なお、これまでに寄せられたご相談のうち、HLAそのものに関する案件については、参考資料集 4.「造血幹細胞移植に関する主治医相談窓口」相談事例(P.42～47)に掲載していますのでご参照ください。

3-4. HLAタイピング結果の精度

下表は様々な方法によるHLAタイピングにより得られた結果の例です。

		HLA-A座	HLA-B座	HLA-DRB1座
血清学的検査	ブロード抗原	A19	B40	DR5
	スプリット抗原	A31	B61	DR11
DNA検査	Low Resolution	A*31	B*40	DRB1*11
	Middle Resolution	A*31:01/31:02	B*40:01/40:06/40:09	DRB1*11:01/11:04/11:05/11:06
	High Resolution	A*31:01:02	B*40:06:01	DRB1*11:04:01

NGS-SBT法はこのレベル

蛍光ビーズ法はこのレベル

「 / (スラッシュ)」は「または」の意

3-5. 用語説明

確定アレル	NGS-SBT法または、SBT法で検査した結果
推定アレル	蛍光ビーズ法等のHLAタイピングによって得られた複数の候補アレルのうち、日本人でもっとも検出されやすいものを推定したアレルを「推定アレル」と表記しています。以前は、「高頻度アレル」、「参考アレル」と表記されていました。
NMDPコード	蛍光ビーズ法によるHLAタイピングで得られた複数の候補アレルをアルファベットでコード化したもので、それぞれのコードは主に第2区域の組み合わせを意味しています。(例: AB=01/02, AC=01/03, BA=01/04/08/13/16など)
座(ローカス)と抗原	「座(ローカス)」とは遺伝子座、つまりHLA-A座、HLA-B座、HLA-DRB1座などを意味します。HLAの適合度については、それぞれの遺伝子座に見られる不一致が「抗原の不一致」なのか「アレルの不一致」なのかを明確にして表現する必要があります。したがって、「1座不一致」や「2座不一致」のような表現は、正確な不適合抗原数・不適合アレル数を表現することができないことに注意が必要です。 例えば、HLA-A座について、患者がA*02:01およびA*26:01を有しており、ドナー登録者がA*02:06とA*26:02を有している場合、抗原としてはA2とA26で一致していますが、アレルの比較では2組の不一致が存在していることとなります。

3-6. HLA検査方法

(1) 蛍光ビーズ法(PCR-rSSO法)

蛍光ビーズ法では、「確定アレル」を特定することはできませんが、NMDPコードで示されるような複数の候補アレルを絞り込むことが可能であり、その中から日本人で頻度の高い代表的なアレルを「推定アレル」としています。

NMDPコード	NMDPコードの内容(可能性があるアレル)	推定アレル
例1) DRB1*01:EW	DRB1*01:01/05/07/08/11	DRB1*01:01
例2) DRB1*15:GEP	DRB1*15:01/06/13	DRB1*15:01

(2) サンガーSBT法(従来用いられていたSBT法)

HLA遺伝子の塩基配列をサンガーシーケンス法によって直接決定するため、蛍光ビーズ法よりも精度の高いタイピングが可能です(第3区域までのタイピングが可能)。しかし、全てのエクソンの配列を決定していないこと、DNA二本鎖の配列を一本鎖毎に決定できないことなどの理由により、多くの場合、単一のアレルを特定することはできません。

①特定不能(Ambiguity)

考えられるアレルの組合せが複数あり、ひとつの組み合わせに特定できないケース
 <<例>>C*01:02、C*03:04:01またはC*01:48、C*03:64:01のどちらかの組合せが考えられます。
 → 蓋然性の高さから、C*01:02、C*03:04:01を検索データとして用いる。

②判定不能

患者の遺伝子欠損、塩基置換、移植歴があるなどの理由で判定できないケース
 口腔粘膜細胞からDNAを抽出して再検査することにより判定できる場合があります。

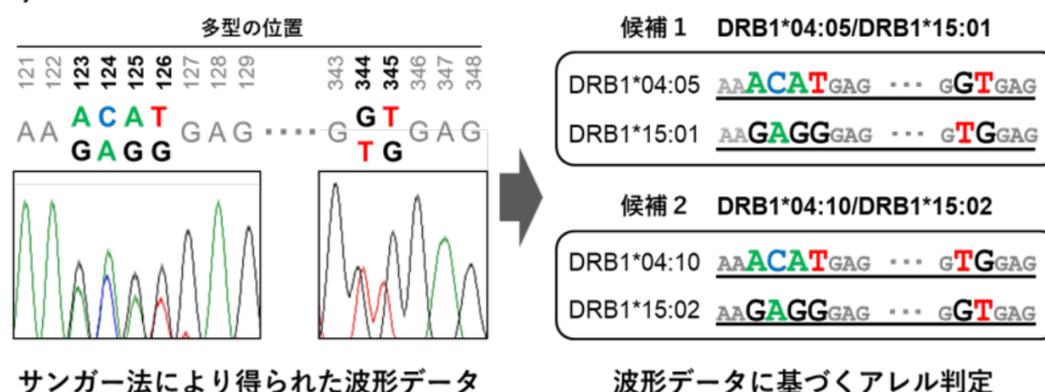
③新規アレル

WHO命名前の新しいアレルと判定されたケース
 WHOのデータベース更新により判定される場合があります。

(3)NGS-SBT法

HLA遺伝子の全領域の塩基配列を次世代シーケンシング(NGS)を用いて、大量かつ並列的に決定可能な、現在もっとも精度の高いHLAタイピング法です。NGS-SBT法にも様々な方法が考案されていますが、骨髄バンクが患者確認検査・ドナーオプション検査で採用している方法では、DNA二本鎖の配列を一本鎖毎に決定することができるため、従来のサンガーSBT法で課題とされていたambiguityによる同定不可能アレルや、Nullアレル、新規アレルなどの同定も可能です。

(A) SBT法



(B) NGS-SBT法



数百~数千リード

患者HLA確認検査結果報告書

施設名 _____ 病院 _____ 科 _____
 移植医師 _____ 先生 FAX _____
 施設名 _____ 病院 _____ 科 _____
 登録医師 _____ 先生 FAX _____

患者 ○ ○ ID 9999991 のHLA確認検査の結果をご報告します。

本データは今回実施されたHLA検査結果および既に得られているデータを併せて記載しております。
 この確認検査結果は今後のドナー検索に活用します。

「1. 患者登録時のHLAデータ」と「2. 患者HLA確認検査結果」とに相違のないことを、必ずご確認ください。

<検査結果>

HLA ローカス	1. 患者の登録HLAデータ		2. 患者HLA確認検査結果	
	血清型	DNAタイピング	血清対応型	確定アレル
A(1)		02:01	A2	02:01:01
A(2)		24:02	A24	24:02:01
B(1)		40:01	B60	40:01:02
B(2)		40:02	B61	40:02:01
C(1)		03:03	Cw9	03:03:01
C(2)		12:02	Cw12	12:02:02
DRB1(1)		14:05	DR14	14:05:01
DRB1(2)		15:01	DR15	15:01:01
DRB3/4/5(1)				3*02:02:01
DRB3/4/5(2)				5*01:01:01
DQA1(1)				01:02:01
DQA1(2)				01:04:01
DQB1(1)			DQ5	05:03:01
DQB1(2)			DQ6	06:02:01
DPA1(1)				01:03:01
DPA1(2)				02:02:02
DPB1(1)				05:01:01
DPB1(2)				

判定抗原: 推定された血清対応型[HLA抗原]を記載させていただきます。HLAタイピングの詳細な結果をご希望の場合は、遺伝子型タイピング(NGS-SBT法)をお勧め致します。(検査方法) NGS-SBT法

HLA確認検査結果報告書

施設名 _____ 病院 _____ 科 _____
 移植医師 _____ 先生 FAX _____
 施設名 _____ 病院 _____ 科 _____
 登録医師 _____ 先生 FAX _____

患者 ○ ○ ID 99999992 血液型 B (+)

ドナー I 98- のHLA再確認検査の結果をご報告します。

本データは今回実施された検査結果および既に得られているデータを併せて記載しております。

<検査結果>

HLA型	ドナー (検索時)		ドナー (検査結果)		患者	
	抗原型	確定アリル	抗原型	確定アレル	検索性データ	
	NMDPコード	参考アレル	NMDPコード	参考アレル		
A(1)	2403	24:03	A2403	24:03:01		02:02
A(2)	33	33:04	A33	33:04:01		31:01
B(1)	35	35:02	B35	35:02:01		46:12
B(2)	44	44:04	B44	44:04:01		52:01
C(1)	10	03:04	Cw14	14:03:02		01:02
C(2)	14	14:04	Cw4	04:04:02		12:02
DRB1(1)	4	04:04	DR4	04:04:01		09:01
DRB1(2)	13	13:03	DR13	13:03:01		15:02
DRB345(1)				4*01:03:03		4*01*03
DRB345(2)				5*01:03:05		4*01:03
DQA1(1)				05:01:02		01:02
DQA1(2)				05:02:02		01:04
DQB1(1)		06:01	DQ6	06:01:02		05:03
DQB1(2)		06:02	DQ6	06:02:02		06:02
DPA1(1)				07:01:02		01:03
DPA1(2)				07:02:02		02:02
DPB1(1)				08:01:02		05:01
DPB1(2)				08:02:01		05:01

(検査方法) NGS-SBT法