

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(A,B,C,DRB1座)	—	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)

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)

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「参考アレル」として第2区域のアレル名(例:HLA-B*40:02)で報告されます。「参考アレル」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。

(注3)

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いません。

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。

※抗原結合ドメインのアミノ酸配列が同じグループをPグループと呼びます。

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

稀なアレルが検出された場合、同じPグループ内の参考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

1. 患者 HLA 確認検査(NGS-SBT法)実施の手続き

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に、速やかに患者 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 10 営業日ほどで 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、DRB4、DRB5、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 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。

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のでお知らせください。

※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) 検体の取り違え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。

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・投薬後でも、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

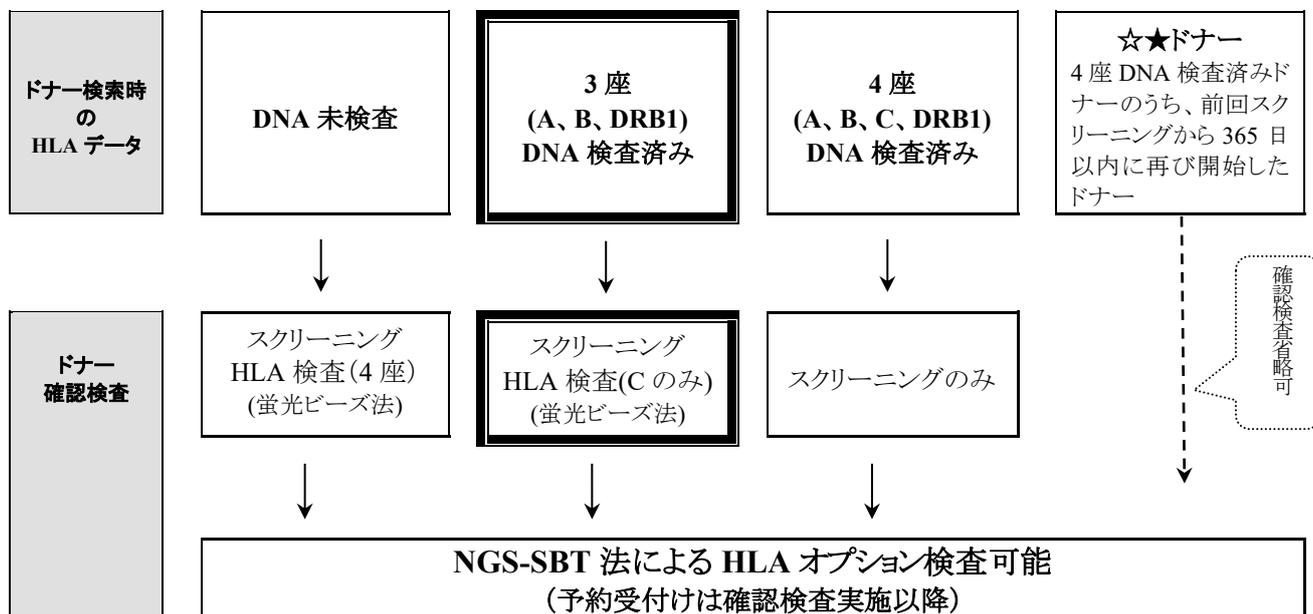
検査の結果、判定不能、特定不能となった場合にも検査料金が発生します。

また、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、ドナー確認検査に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、「参考アレル」として報告されています。「参考アレル」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。「参考アレル」の結果を解釈するには、以下の点にご留意ください。

- ① ドナー登録者の「参考アレル」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「参考アレル」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 「参考アレル」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が留意が必要です。

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「参考アレル」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)」

<http://jshi.umin.ac.jp/standarization/file/JSHI-hyoki-2017-2.pdf>

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。

HOME＞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.43～49)にご紹介しています。ご参考ください。

3-5. 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

3-6. 用語説明

確定アレル	HLA 遺伝子全領域(エクソン、イントロン、5'-非翻訳領域、3'-非翻訳領域)の遺伝子配列に基づき特定されたアレルを「確定アレル」と呼び、NGS-SBT 法では一部の場合を除き、ひとつの確定アレルを同定可能です。
参考アレル	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「参考アレル」(以前の「高頻度アレル」と表記しています)。
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。

3-7. 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「参考アレル」としています。

NMDP コード	NMDP コードの内容 (可能性のあるアレル)	参考アレル
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(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

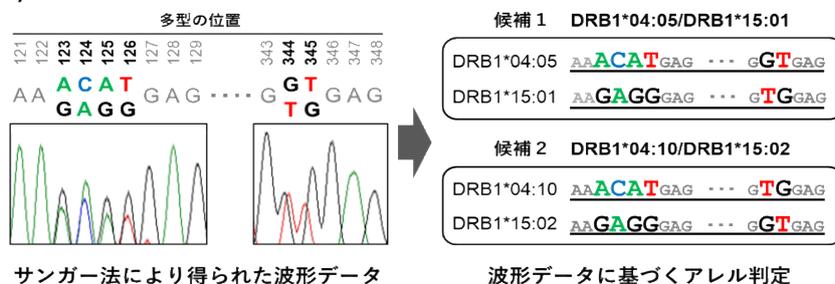
WHO 命名前の新しいアレルと判定されたケース

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

リード1 ... AA A C A T G A G ... G G T G A G ... ➡ DRB1*04:05
リード2 ... AA G A G G A G ... G T G A G ... ➡ DRB1*15:01
リード3 ... AA A C A T G A G ... G G T G A G ... ➡ DRB1*04:05
リード4 ... AA G A G G A G ... G T G A G ... ➡ DRB1*15:01

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