

文書番号 -	検査基準書	使用版番号	第○版
		7頁の内 1頁	

検査基準書

承認	確認	確認	作成
年 月 日	年 月 日	年 月 日	年 月 日

〇〇〇〇

制定日 年 月 日

改訂日 年 月 日

文書番号 -	検査基準書	使用版番号	第○版
		7頁の内 2頁	

改訂履歴

版数	改訂日 年 月 日	改 訂 事 項	承認者
1			

配布日/配布先一覧

配布先						
配布日	第0版					

目次

1、 目的

2、 適用範囲

制定日 年 月 日

改訂日 年 月 日

文書番号 -	検査基準書	使用版番号	第○版
		7頁の内 3頁	

3、責任体制

4、遵守事項

5、手順

5.1 試験方法に関する事項

5.2 検査精度管理

5-2-1 試薬管理

5-2-2 機器管理

5-2-3 試験手順書

5-2-4 測定値信頼性評価

5-2-5 外部精度管理

5-2-6 検査担当者の教育

5-2-7 逸脱管理

5-2-8 分析法バリデーション

5-2-9 その他

5.3 試験結果の判定に関する事項

6、様式

7、関連する文書

1. 目的

この検査基準書(以下、本基準書)は、HLA試験を行うにあたり、試験方法、精度管理、分析法の妥当性および適格性確認等の遵守すべき基準を規定として定めるものである。

2. 適用範囲

○○○○で行われる試験に関わる全ての事項に適用する。

3. 責任体制

この基準書は、検査責任者が作成し、○○○○管理者職名(以下、管理者名)が承認する。検査責任者が全てのHLA試験に対して、責任と権限を有する。

4. 遵守事項

造血幹細胞における抗HLA抗体検査に関する指針、造血細胞移植ガイドライン、認定組織適合性検査施設認定制度、再生医療等の安全性確保等に関する法律などの関連法規・ガイドライン等を参考または準用する。

試験方法の妥当性確認には常に最新のレギュラトリーサイエンスなどの情報収集を行い、試験の信頼性の確保に努める。

制定日 年 月 日

改訂日 年 月 日

文書番号 -	検査基準書	使用版番号	第〇版
		7頁の内	4頁

5. 手順

5.1 試験方法に関する事項

試験方法は、文献、学会等で認知されたもの等の公的に認知された試験法を採用する。
新しい試験法を採用する場合には、その試験方法を十分に評価・検証し、その結果を持って採用するものとする。

各試験は、試験毎に試験実施手順を定めた文書を作成し、試験担当責任者の承認を得る。

試験担当責任者は試験指図書を発行し、各担当者に試験を行わせる。

当研究所で行う試験法は、下記2種に分類される。

各試験法の詳細は、各試験手順書を参照のこと。

以下に概要を示す。

1) 抗HLA抗体検査

超急性を含む拒絶反応を惹起するドナーHLA 抗原に反応するHLA 抗体=Donor Specific Antibodies (DSA) の存在を把握するため、標的にドナーリンパ球を使用するクロスマッチ (リンパ球交差試験) ①と、標的にHLA分子をコーティングした、マイクロビーズ (疑似リンパ球) を使用するHLA抗体検査を実施する試験②がある。

1 リンパ球クロスマッチ(XM)はドナー(allogeneic XM)、自己(auto XM)に特異的なリンパ球細胞障害性抗体を検出するため、22℃および37℃で30~60min程度共培養する。標的細胞は全リンパ球、T 細胞、B 細胞とし、顕微鏡下観察で11%以上の死細胞で陽性とする。

2 標的にHLA分子をコーティングした、マイクロビーズ(疑似リンパ球)を用いるキットを利用する。FCMや、蛍光ビーズ測定装置 (Luminex) を使用し、高い感度を有する測定法である。HLA 抗体存在の有無の判定とHLA 抗体の特異性を決定する2 種類のキットが存在する。

2) HLAタイピング

① HLA-A.B.C.DR.DQ.DP型測定

人由来細胞からDNAを抽出しPCRで増幅する。HLAの遺伝子領域のPCR 産物より、シーケンスプライマーを用いてシーケンス反応を行い、シーケンサーで泳動して塩基配列を決定する。これを、既知のHLAアレルの塩基配列と照合してHLAアレルを判定する。

② 次世代ゲノムシーケンス (Next-Generation Sequencing :NGS法)

サンガー法によるシーケンス方法を大量並列化処理にして大規模化した方法。

断片化し、NGS用に調製したDNAライブラリーをテンプレートとし、蛍光色素のついた塩基で再合成するときに放出されるシグナルで配列を特定する。

NGSで読み取った塩基の鎖(リード)を、既知のリファレンスゲノム(参照配列)を土台としてアセンブルし直すか(リシーケンス)、既知のHLA 型のデータベースと比較する。アライメントしたリード全体から、元のサンプルのゲノム配列全体を明らかにする。

5-2 検査精度管理

制定日 年 月 日

改訂日 年 月 日

文書番号 -	検査基準書	使用版番号	第○版
		7頁の内 5頁	

以下の信頼性保証の手順により試験精度の維持・向上を図る。

5-2-1 試薬管理

検査に使用されるHLA試験用試薬は研究開発途上のため、その管理には十分な注意を払わなければならない。

受入試験およびロットごとの性能確認を行う。

受入試験には上記コントロールによるロットごとの確認と目視試験を行う。

目視試験として

- 1 品名・規格の確認
- 2 試薬メーカーの品質証明書の受領
(品質証明書の正しさの担保として、メーカーへの現場または文書査察を行い、メーカーの信頼性を確認して、その確認記録を残す)
- 3 使用期限の確認
- 4 汚染・包装

を行い、記録に残す。

ロット確認は、試験をおこなったことから得られる各種データを分析して品質の傾向および低下をチェックする。

温度管理は、メーカー規程の条件を守り、品質低下を避けなければならない。

詳細は品質管理基準書を参照する。

5-2-2 機器管理

試験機器の性能は試験精度に大きく影響する。

よって機器は日常点検、定期点検、定期的バリデーションまたはキャリブレーション等を通じて性能の確認を実施し、Log Bookなどの規定の様式に記録を残す。

詳細は品質管理基準書を参照する。

5-2-3 試験手順書

試験精度の信頼性を保つため、試験手順を記載した手順書の品質は重要な因子である。

よって手順書作成には以下の点に注意して作成する。

A) 準備の方法

- 1 検体受け取り準備方法
- 2 検体受入試験の確認項目
- 3 検体の試験前一時保管手順(温度・機器)
- 4 試験機器使用前洗浄手順
- 5 機器始業点検手順
- 6 分析用試薬名と、その準備(使用量、容器等)
- 7 使用器具名と、その準備(規格、数量等)
- 8 試薬調製手順(使用期限も)
- 9 標準品と調製手順、および使用量、検量線の作成手順

B) 機器条件設定

- 1 測定条件の設定
- 2 操作手順
- 3 計算方法
- 4 装置の維持管理

C) 試験手順

- 1 試験を行う者はだれでも理解できるように記述する。
- 2 試験品質を落とさない程度の精密さで記述する。

D) 記録の作成と保管

- 1 試験にかかわるすべての記録(記録名と、記録手段)
- 2 記録保管手順(承認ライン、保管場所、期間等)

E) 安全管理

- 1 毒物・危険物試薬の取り扱い方法

制定日 年 月 日

改訂日 年 月 日

文書番号 -	検査基準書	使用版番号	第○版
		7頁の内 6頁	

- 2 検体、試薬等の廃棄手順
- 3 高圧容器の取り扱い方法

5-2-4 測定値信頼性評価

一般に内部精度管理のための信頼性評価試験に利用されているx-R管理図法(品質特性値が長さ、重量、時間、電気抵抗、引張りの強さ、純度などの場合に用いる)、クロスチェック法(複数台の装置を使用している場合の検査データの一致性を確認する)、既知濃度(単位)試料と検体の同時測定法などは、各測定機器の設定用または校正用標準品(コントロール)を用い信頼性評価試験を行う。

信頼性評価試験として、分析法バリデーションの併行精度(Repeatability/ Intra-assay precision)、室内再現精度(Intermediate precision)、室間再現精度(Reproducibility)に準じた試験を実施し信頼性を確保する。

以下にその事例を示す。

- A) 各測定機器の標準品(コントロール)を用意する。
- B) 実施計画書および記録書を作成し、試験ごとにその記録を作成する。
- C) 得られたデータは、統計処理を行い(標準偏差、相対標準偏差(変動係数)及び標準偏差の信頼区間なども記載する)、判定する。
- D) 記録は月?回の品質会議で確認され、年1回の品質マネジメントレビューに報告し、承認を受ける。
- E) 週一回の間隔で下記試験を実施する。試験の組み合わせは仕事量、業務予定などを勘案して行ってもよい。
 - 1 試験室、試験者、装置、器具及び試薬のロットなどの分析条件を変えずに繰り返し試験を行い、HLA型の試験結果に変化がないことを確認する。
 - 2 試験者、試験日時、装置、器具及び試薬のロットなどの一部又は全ての分析条件を変えて試験を行い、HLA型の試験結果に変化がないことを確認する。
 - 3 外部試験機関と提携し、同じ検体を相互に試験して結果に相違がないことを確認する。

5-2-5 外部精度管理

公的な外部機関の日本組織適合性学会 QC ワークショップに参加し、検体分析などを通じて○○○○の分析能力の客観的評価を受ける。

参加の方法は日本組織適合性学会の参加規定による。

外部評価が低い場合、以下の点の見直し、改善等を図る。

- 1 教育訓練(内容・時期・方法)
- 2 試験法(試験方法:別法、分析法バリデーション)
- 3 試薬・資材(再選定、保管条件)
- 4 試験機器(再選定、校正方法、クオリフィケーション)

改善会議の議事録を維持する。

5-2-6 検査担当者の教育

試験精度の維持向上には検査担当者のHLAおよび組織適合性検査に係る知識・技術を高く維持することが必要である。

組織適合性検査に関して、日本組織適合性学会等の外部組織・機関により認定を受けるための教育を行う。

また、力量表等を通して担当者の力量を把握し、計画的かつ定期的に行うこととする。

その方法は教育訓練に関する手順書に規定する。

5-2-7 逸脱管理

逸脱およびラボエラー等の人為的ミスの発生および再発を防止するため、逸脱管理を行う。

その再発防止策および是正措置等の規定を逸脱管理に関する手順書で規定する。

文書番号 -	検査基準書	使用版番号	第〇版
		7頁の内	7頁

5-2-8 分析法バリデーション

HLA試験に使用される試験法は、その分析法バリデーションで適格性を検証していなければならない。

分析法バリデーションの詳細については、日本薬局方17参考情報G1理化学試験関連分析法バリデーション、およびICH-Q2分析法バリデーションの項を参照する。

妥当性は、日本組織適合性学会等の公的機関によるガイダンスおよび文献等により確認する。

HLA試験は定量試験ではなく定性試験なので、バリデーションは特異性のみで良いとする。

ただし、試験法の適格性評価に必要な標準品および不純物の入手および自家作成が困難なため、分析法バリデーションは適格な(公的な、または自家作成可能な)標準品および不純物が確保できるまで保留とし、そのかわり、5-2-4測定値信頼性評価の結果および出力された試験結果のレビュー、試験機器の稼働性能テスト等などを通して試験の適格性を検証する。

既存試験法の問題点・改善点や新たな試験法の採用に関しては、各種情報を検査責任者および品質管理責任者が収集・確認し、情報の共有化を図らなければならない。

5-2-9 その他

その他必要な精度管理および信頼性保証の規定は品質管理基準書に規定する。

5.3 試験結果の判定に関する事項

試験の適否判定を行う上で、必要な事項を記載した試験判定の手順書を作成し、試験結果のみでなく、試薬管理、試験手順の適否、機器管理等を鑑みて総合的に判断し、判定を行う。

試験判定は検査責任者が行い、○○○○の承認を得る。

6. 様式

各手順書等に規定する。

7. 関連する文書

検査業務規程
品質管理基準書
各種試験手順書
日本薬局方
ICH-Q2 A,B