



抗体検査のいろは

ベリタスWeb講習会配布資料

株式会社ベリタス

2021/09/16

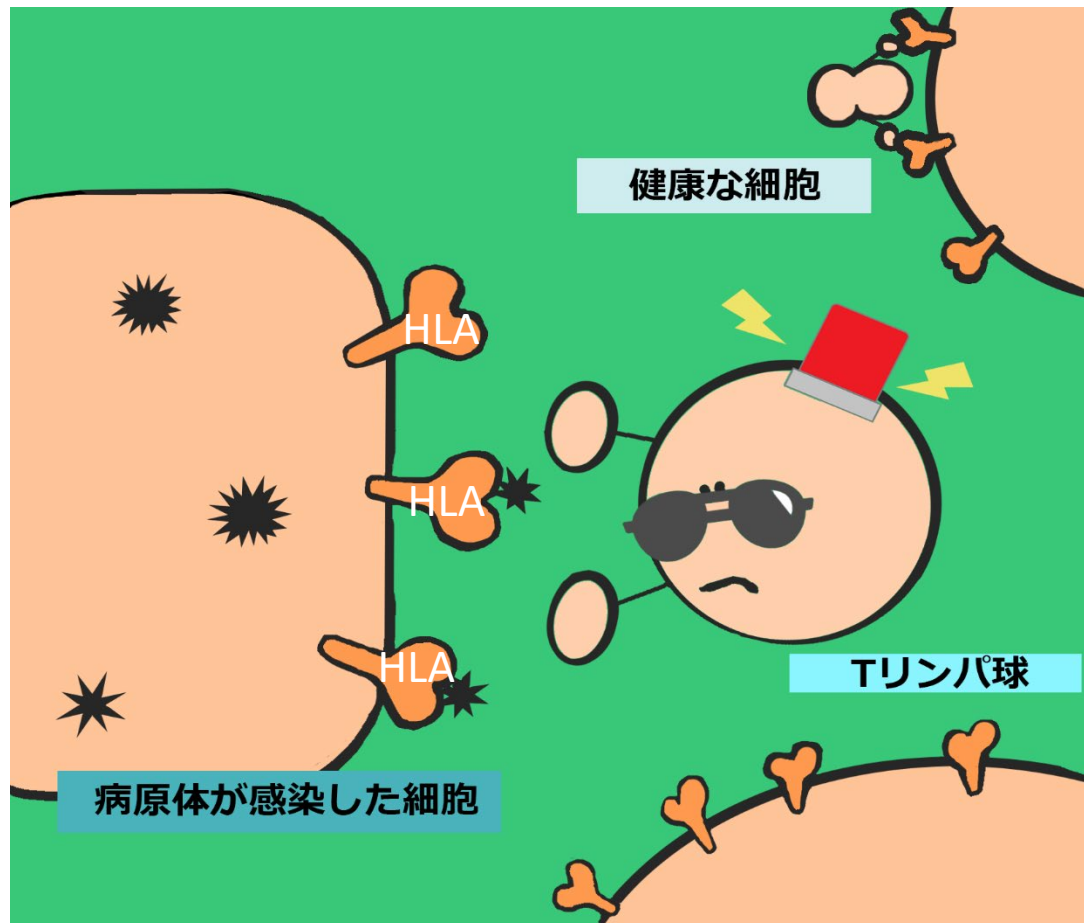
目次

- HLAとは
- LABScreen試薬
- LABScreen Mixedの解析
- LABScreen Single Antigenの解析
- 検体の前処理

HLAとは

HLAの役割

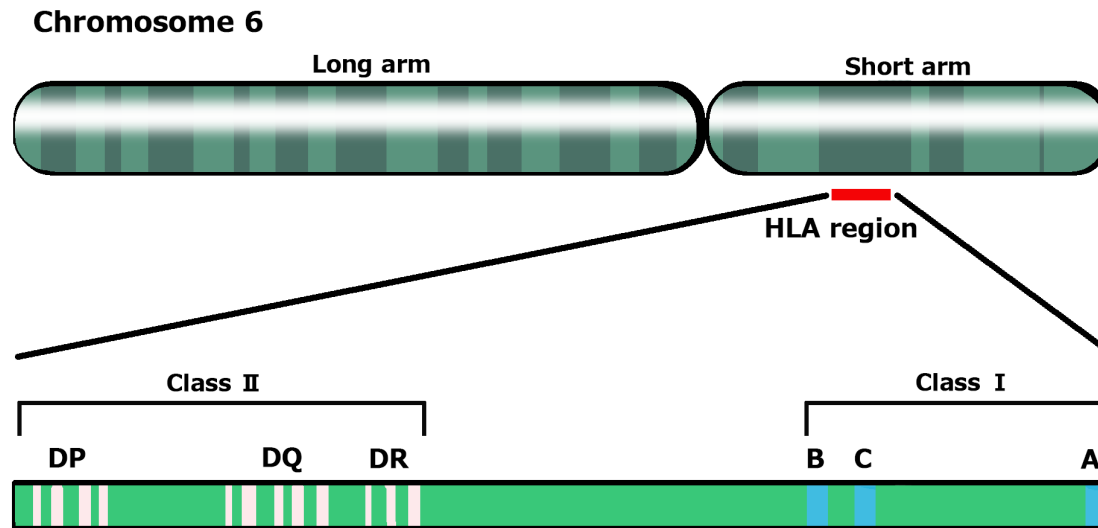
- 生体防御のために自己非自己を見分けるための重要分子



HLA(Human Leukocyte Antigen)

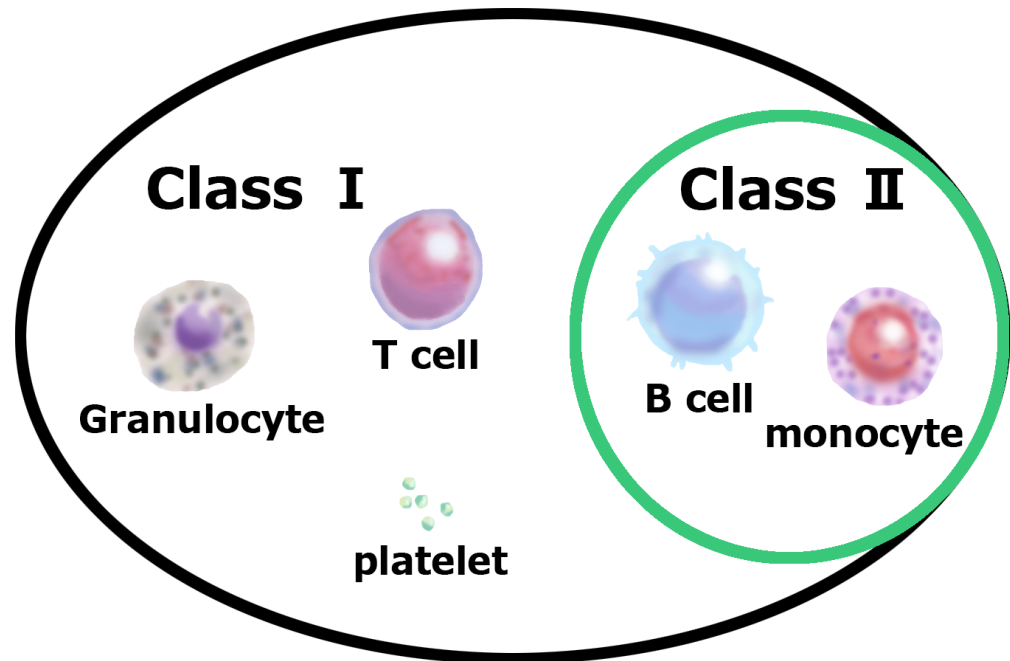
- ヒト白血球抗原
- 1984年に発見
- 第6染色体の短腕部に存在
- A, B, C, DR, DQ, DPなど多くの抗原で構成

HLA Complex



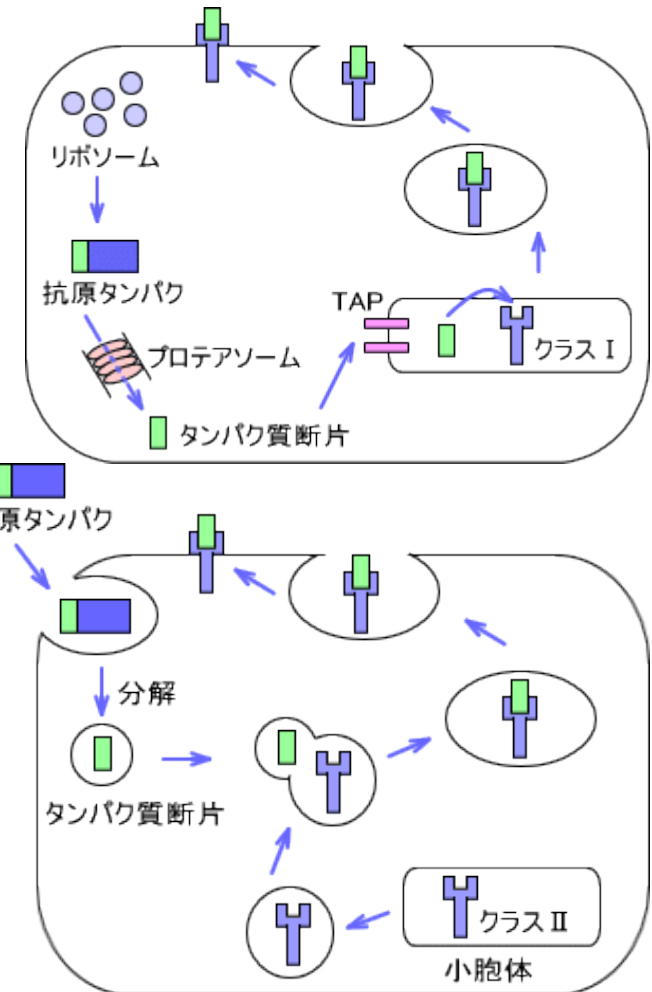
Class IとClass IIの発現

- Class I : A, B, C
 - ほとんどの有核細胞、血小板等に発現
- Class II : DR, DQ, DP
 - 抗原提示細胞に発現



Class I と Class IIの役割

- HLA Class I : A, B, C
 - 細胞内で合成されたタンパク質の一部(ペプチド)を抗原提示
 - 合成されたタンパク質はプロテアソームによって分解
 - キラーT細胞により認識
- HLA Class II : DR, DP, DQ
 - 細胞外から入ってきたタンパク質(ペプチド)を抗原提示
 - マクロファージのような異物を貪食する細胞が関与
 - 取り込まれた外来性タンパク質はリソソームによって分解
 - ヘルパーT細胞により認識

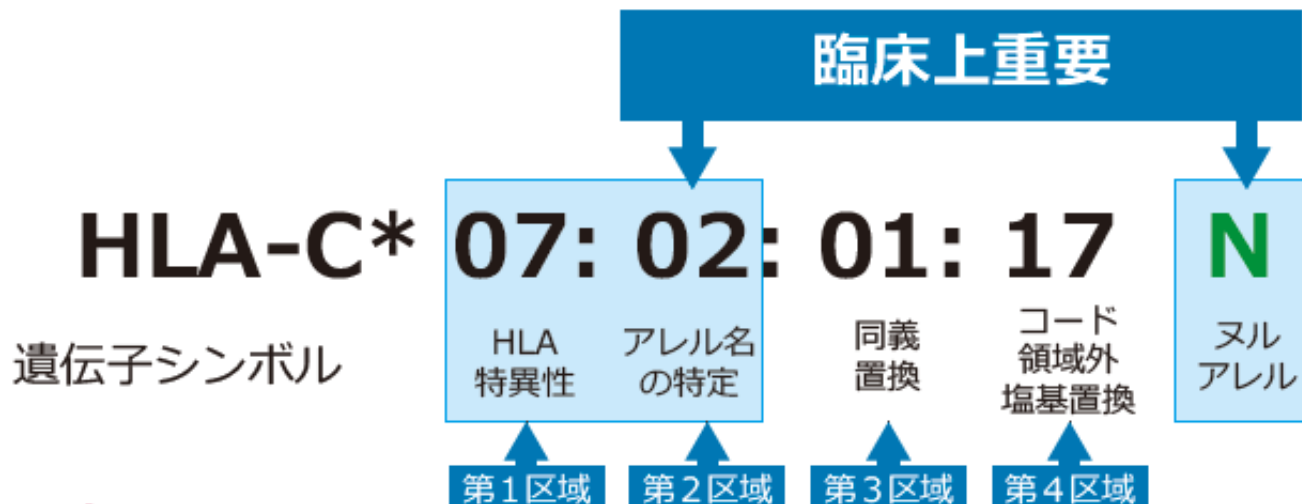


HLA抗原の種類

A	B	C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	B49(21)	Cw1	Dw1	DR1	DPw1
A2	B7	B50(21)	Cw2	Dw2	DR103	DPw2
A203	B703	B51(5)	Cw3	Dw3	DR2	DPw3
A210	B8	B5102	Cw4	Dw4	DR3	DPw4
A3	B12	B5103	Cw5	Dw5	DR4	DPw5
A9	B13	B52(5)	Cw6	Dw6	DR5	DPw6
A10	B14	B53	Cw7	Dw7	DR6	
A11	B15	B54(22)	Cw8	Dw8	DR7	
A19	B16	B55(22)	Cw9(w3)	Dw9	DR8	
A23(9)	B17	B56(22)	Cw10(w3)	Dw10	DR9	
A24(9)	B18	B57(17)		Dw11(w7)	DR10	
A2403	B21	B58(17)		Dw12	DR11(5)	
A25(10)	B22	B59		Dw13	DR12(5)	
A26(10)	B27	B60(40)		Dw14	DR13(6)	
A28	B2708	B61(40)		Dw15	DR14(6)	
A29(19)	B35	B62(15)		Dw16	DR1403	
A30(19)	B37	B63(15)		Dw17(w7)	DR1404	
A31(19)	B38(16)	B64(14)		Dw18(w6)	DR15(2)	
A32(19)	B39(16)	B65(14)		Dw19(w6)	DR16(2)	
A33(19)	B3901	B67		Dw20	DR17(3)	
A34(10)	B3902	B70		Dw21	DR18(3)	
A36	B40	B71(70)		Dw22		
A43	B4005	B72(70)		Dw23	DR51	
A66(10)	B41	B73		Dw24	DR52	
A68(28)	B42	B75(15)		Dw25	DR53	
A69(28)	B44(12)	B76(15)		Dw26		
A74(19)	B45(12)	B77(15)				
A80	B46	B78				
	B47	B81				
	B48	B82				
		Bw4				
		Bw6				

ブロード抗原: スプリット抗原: アソシエート抗原

HLAの表記方法



表記レベル

Low Resolution

07

アミノ酸配列に
違いがある

07: 02

High Resolution

07: 02: 01

07: 02: 01: 17

N

Nは第3区域に来ることも多い

LABScreen試薬

なぜ抗体検査を行うのか

- 移植前
 - 患者の体内にドナーに対する抗体が存在することが移植後の臓器生着に影響を及ぼす
- 移植後
 - DSA(Donor Specific Antibody)の存在は生存率の低下につながる
 - 定期的に抗体検査を行いDSA発現の有無をモニタリングすることが重要

移植前後で抗体の有無を検査することが患者様の予後の改善につながる

保険収載内容 (2020/4更新)

- 臓器移植

実施時期	検査内容	点数
移植前	抗HLA抗体検査	4000点
移植後	スクリーニング検査(抗体の有無を見る)	1000点
	抗体特異性同定検査(スクリーニング検査で陽性の場合のみ、陽性のアレルを同定する)	4850点

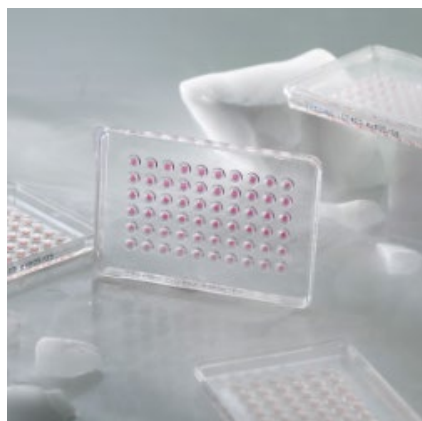
- 造血幹細胞移植

- 移植前に抗HLA抗体検査を実施した場合に4000点

- 全ての検査において、検査方法・試薬の指定はない

抗HLA抗体検査の歴史

- より大量検体へ
- より高感度へ
- より高精度へ

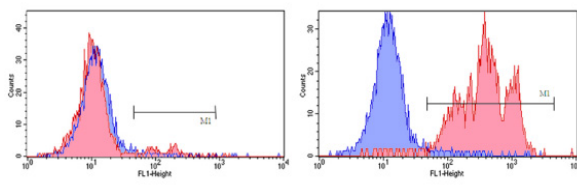


LAT
(ELISA)

LCT
(細胞障害性
試験)

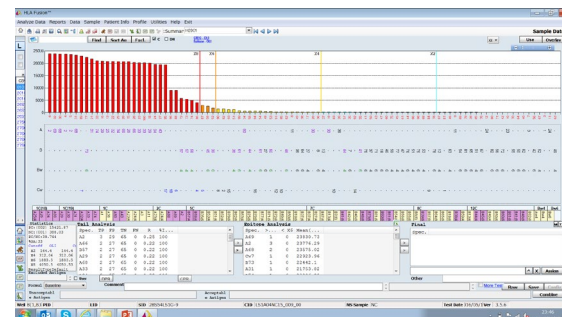


ANTIBODY
DETECTION



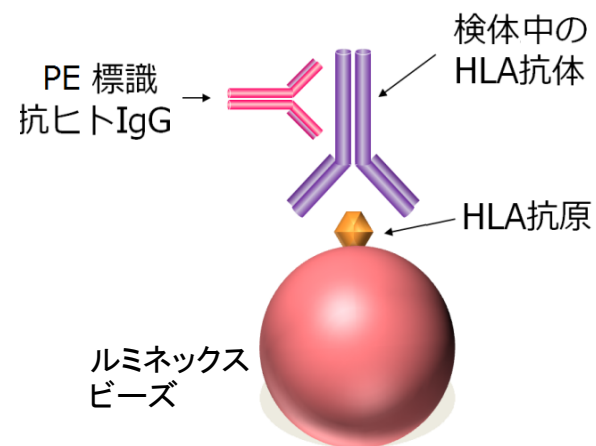
FlowPRA
(フローサイト
メーター)

LABScreen
(Luminexビーズ)

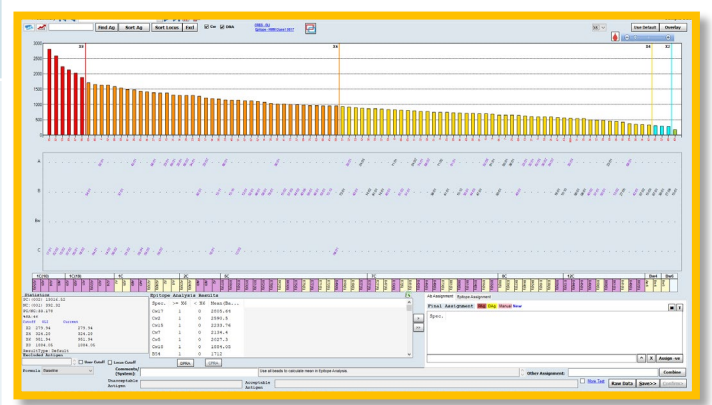


LABScreen試薬の種類


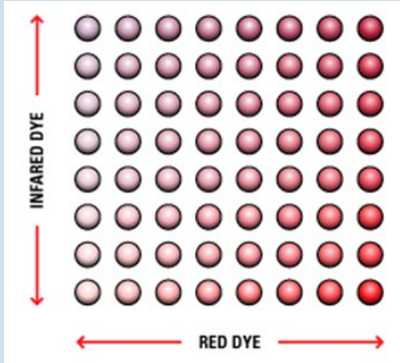


試薬名	目的
LABScreen Mixed	スクリーニング
LABScreen PRA	スクリーニング ある程度の特異性
LABScreen Single Antigen	抗体特異性の同定 DSA(Donor Specific Antibody)の検出 nMFI値の算出
<ul style="list-style-type: none"> LABScreen Single Antigen Supplement LABScreen Single Antigen ExPlex (LABScan3D専用) 	抗体の同定 DSA(Donor Specific Antibody)の検出 nMFI値の算出 日本人に特有なHLA抗原を多く含む



専用解析ソフトHLA Fusionで解析



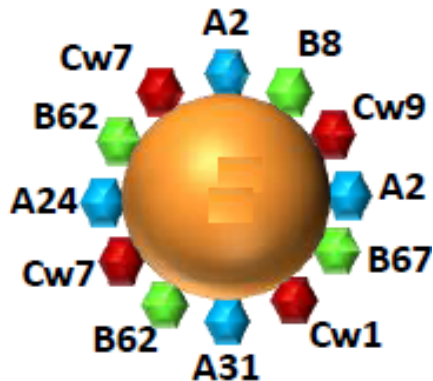
LABScreenの測定装置 (LABScan/医療機器)

名称		ビーズ数	試薬
LABScan システム		100色 (10 × 10) 	ExPlexは使用不可
LABScan 3Dシステム		500色 (10 × 10 × 5) 	全て使用可能

Mixed, PRA, Single Antigenの違い

Mixed

17種ビーズ



Class1: 3パネル/1beads

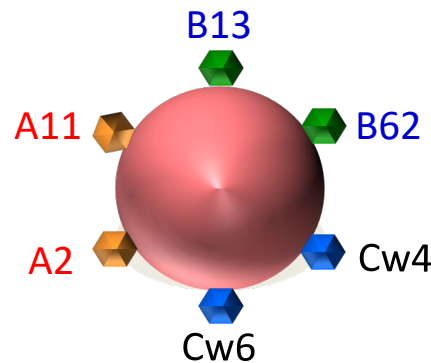
Class2: 5パネル/1beads

細胞株からの抽出抗原

PRA

Class1:55種ビーズ,

Class2:35種ビーズ

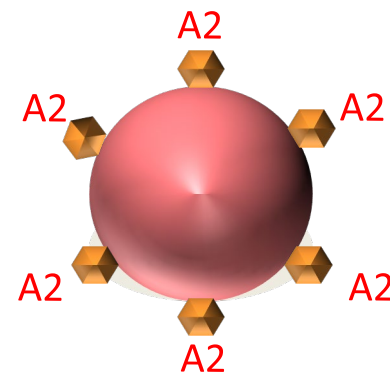


1パネル/1beads

Single Antigen

Class1:97種ビーズ

Class2:95種ビーズ



1抗原/1beads

組換え体からの精製抗原

*1パネル=1人分のハプロタイプ

試薬に含まれる抗原情報



One LambdaのホームページよりDatasheetsをダウンロード

Product Description

Overview Product Documentation

Refine By:

Product Line Files

- Product Inserts/Instructions For Use
- Product Sheets/Brochure
- Reference Sheet/Tables
- SDS

Catalog Number

LS1A04

Language

English

Lot Specific Files

- Certificate of Analysis
- Luminex Templates
- Software Analysis Files
- Worksheets/Datasheets

Product Lot/Software Version

013 x

1 Results found for LABScreen™ Single Antigen

Notice: Download functionality is optimized for IE 10 and above. Downloads are limited to 50 documents at a time.

Download >



▼ LABScreen Single Antigen (1)

Download	Publish Date	Title	Type	Catalog #	Lot or Version	Select
	05/13/2021	LABScreen Single Antigen HLA Class I - Combi, Lot 013 - Worksheet	Worksheets/Datasheets	LS1A04	013	<input type="checkbox"/>

DataSheetの例

Mixed

Beads ID	Ag. ID	Cell ID	Panel Typing								*Normalized Background Value
			A		B		Bw		C		
1	NC	NC									NA
2	PC	PC									17101
6	Class 1/1	G0229	1	80	18	50	0	X	2	0	64
		E5732	1	29	8	45	0	X	0	7	
		E41074	1	09	8	55	0	X	1	7	
9	Class 1/2	G0072	11	24	35	02	0	X	4	9	54
		E2934	2	24	54	07	0	X	1	7	
		G0313	2	31	02	07	0	X	7	X	
		E12627	2	24	00	46	0	X	1	10	

全ての試薬に共通して、
1番ビーズにNC、2番
ビーズにPCを含む

PRA

Bead ID	Antigen ID	Molecular Typing					
		A		B		C	
1	NC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	PC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	C4966	A*02:01	A*02:07	B*46:01	X	C*01:02	X
4	E19109	A*01:01	A*23:01	B*49:01	B*55:01	C*03:03	C*07:01
5	G0142	A*11:02	A*24:02	B*27:06	B*40:01	C*03:04	X

Single Antigen

Bead ID	Antigen ID	Molecular Typing	Serological Typing	*W6/32	Results
1	NC	NA	N/A	167	
2	PC	NA	N/A	375	
3	rA0101	A*01:01	A1	22437	
4	rA0201	A*02:01	A2	22449	
5	rA0203	A*02:03	A2	22359	
6	rA0206	A*02:06	A2	21681	

NCビーズとPCビーズ

- NCビーズ

- HLA抗原が何も結合していないビーズ
- 理論的には検体内に抗HLA抗体以外のタンパク質が何も含まれない場合はゼロとなる
- 1500以上の場合は再検査

- PCビーズ

- 精製されたヒトIgGが結合しているビーズ
- 二次抗体が必ず結合するため二次抗体の劣化の指標となる
- 500以下の場合は再検査

Position / Sample	System Comment	Min BeadCnt	NC	PC	PCNCRatio
1(1,A1) Unknown1		100	75.78	11897.81	157.005
2(1,B1) Unknown2	Low NC	100	25.98	14107.37	543.009
3(1,C1) Unknown3	Low NC	100	24.25	15525.61	640.231
4(1,D1) Unknown4	Low NC	100	0.73	14333.48	19634.9

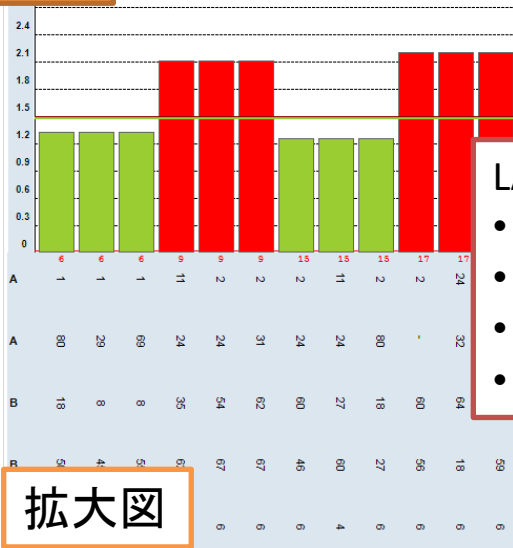
LABScreenの再検査基準

- MinBead Cnt: 50以上
- NC:1500以下
- PC : 500以上
- PC/NCRatio:2以上

解析画面での確認

Mixed

Single Antigen



- LABScreenの再検査基準
- MinBead Cnt: 50以上
 - NC:1500以下
 - PC : 500以上
 - PC/NCRatio:2以上

拡大図

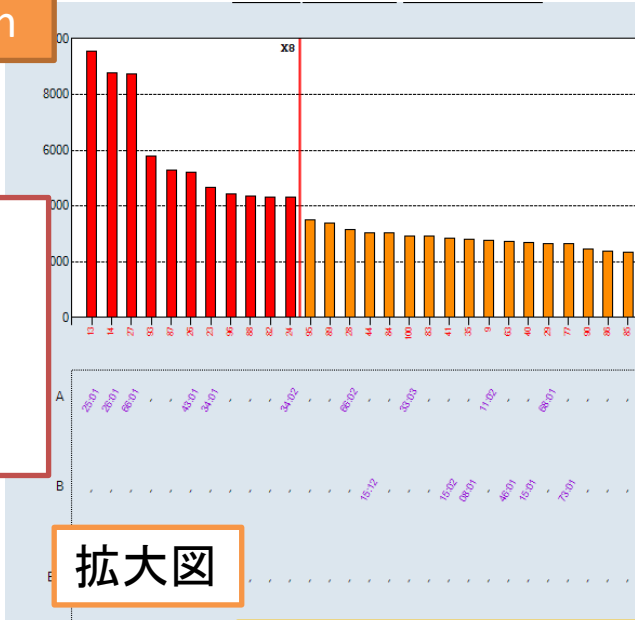
Statistics

PC: (002) 14375.2
 NC: (001) 23.32
 PC/NC: 616.43

Class I & II MIC

Class	Off	Default	Current
CL I +ve	1.5	1.5	1.5
CL I -ve	1.49	1.49	1.49
CL II +ve	1.5	1.5	1.5
CL II -ve	1.2	1.2	1.2

Class I
 Computer Assignment Positive
 Final Assignment
 Positive
 Negative
 Undetermined



拡大図

Statistics

PC: (002) 15525.61
 NC: (001) 24.25
 PC/NC: 640.231

1C(10) 1C(19)

Sample	Count	Count
A25	1	0
A26	1	0
A66	2	0
Cw15	1	0
Cw5	1	0
A43	1	0
A34	2	0

Formula Baseline

Comments/ (System):

Unacceptable Antigen

LABScreenの操作

前処理

- 検体(血清を推奨)を凍結融解、転倒混和
- 遠心(8,000g -10,000gで10分間)後、中間層の検体を使用

反応

- ビーズ5ulと検体20ulを混合
- 遮光、室温(20-25°C)で振とうしながら30分間反応

洗浄(3回)

- 洗浄バッファーを加え遠心(1,300gx5分または1,500gx3分)
- フリッキング、タッピング、ドライボルテックス

PE標識

- 100倍希釈した二次抗体を100ulずつ添加
- 遮光、室温(20-25°C)で振とうしながら30分間反応

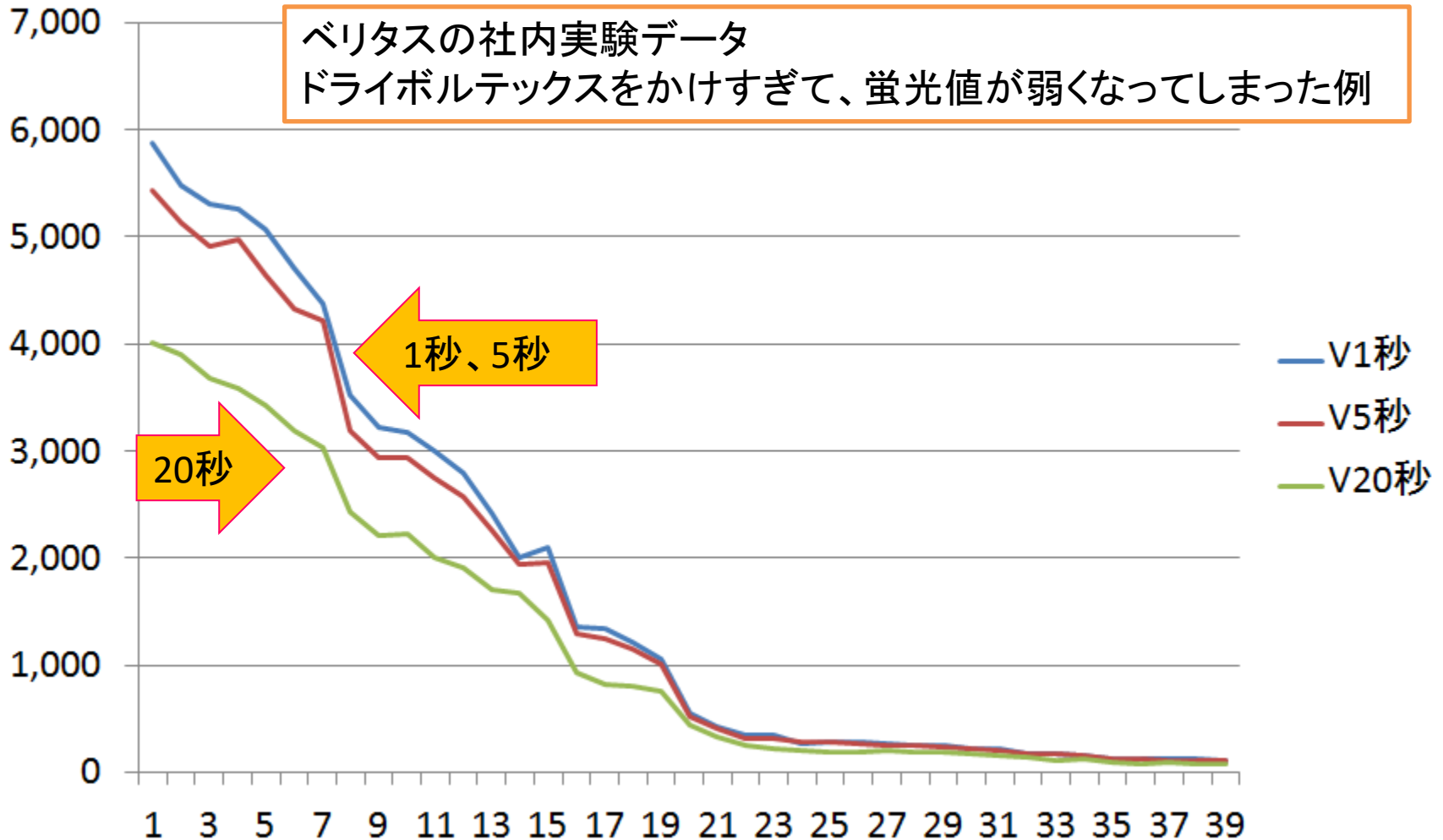
洗浄(2回)

- 洗浄バッファーを加え遠心(1,300gx5分または1,500gx3分)
- フリッキング、ドライボルテックス、タッピング

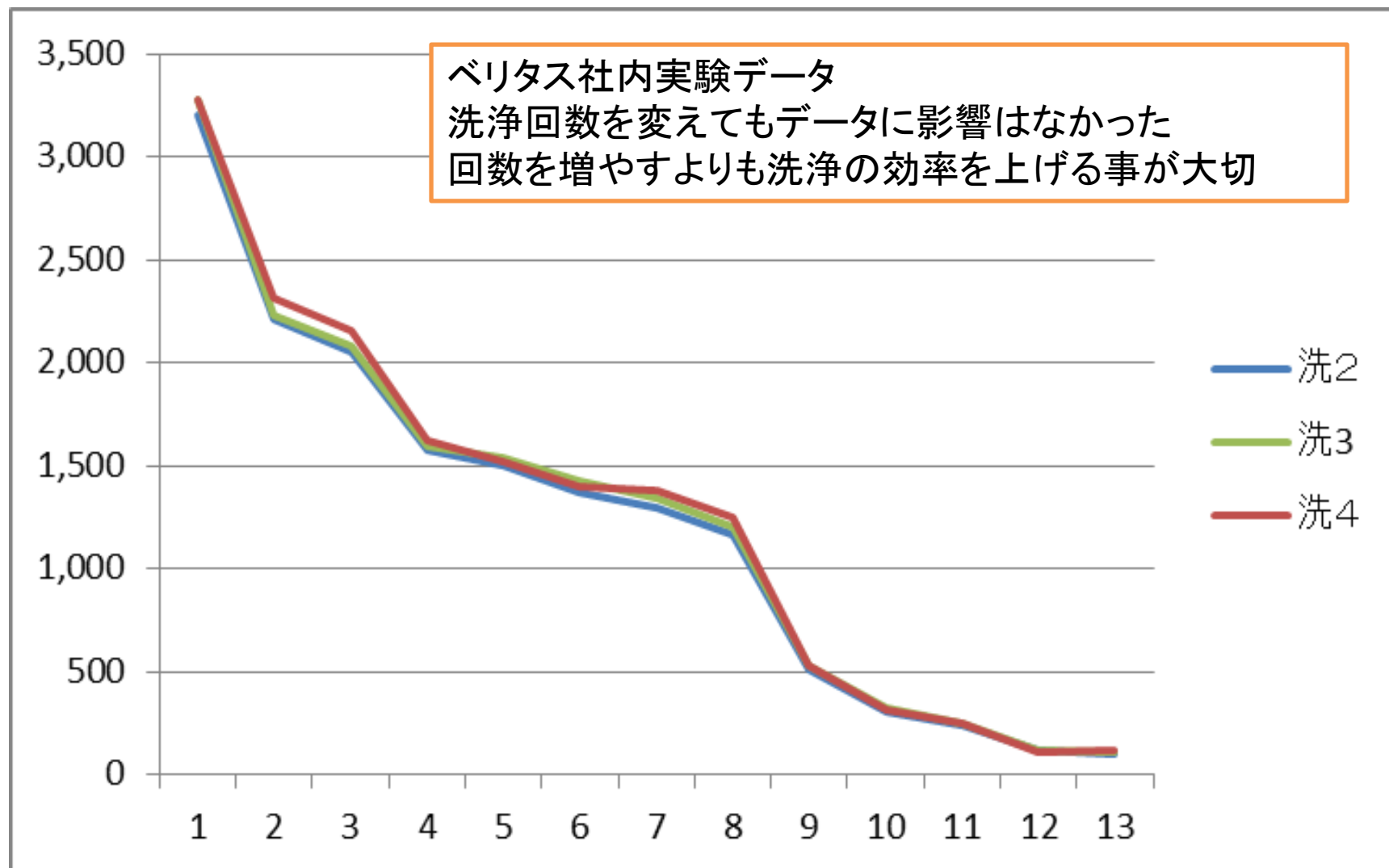
- 背景
 - 患者血清中には不純物が含まれる
- 操作方法
 - 検体の凍結
 - 解凍後遠心(8,000~10,000G、10分間以上)
 - 遠心後、中間層より検体を回収する
- 注意点
 - 高速回転の遠心機を使用するとなお良い
 - 不純物が多い検体は、遠心速度、時間を増やす



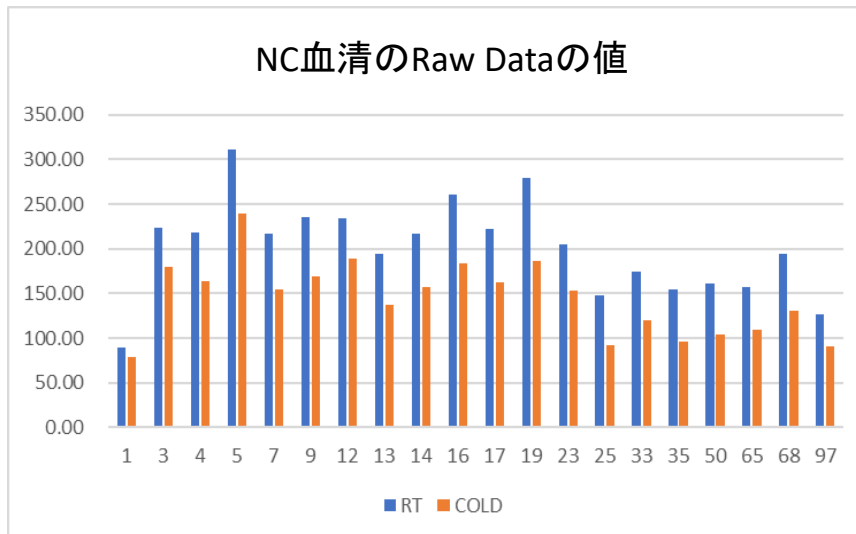
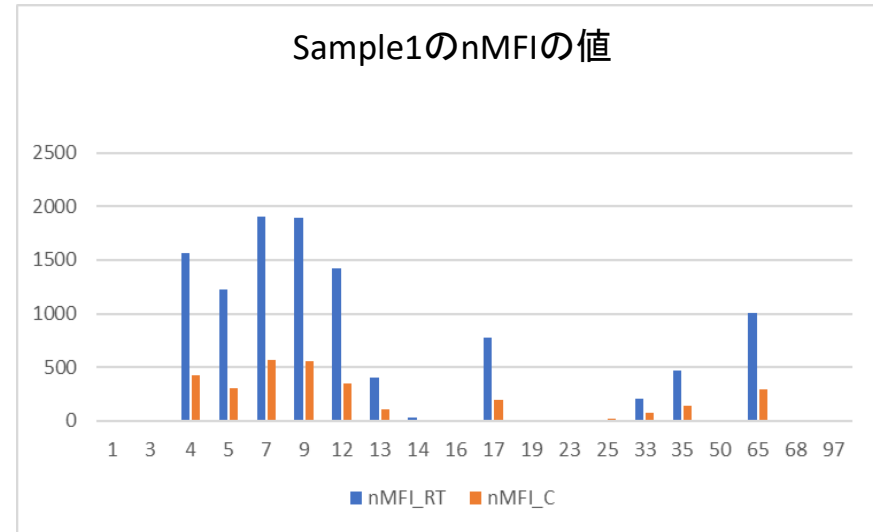
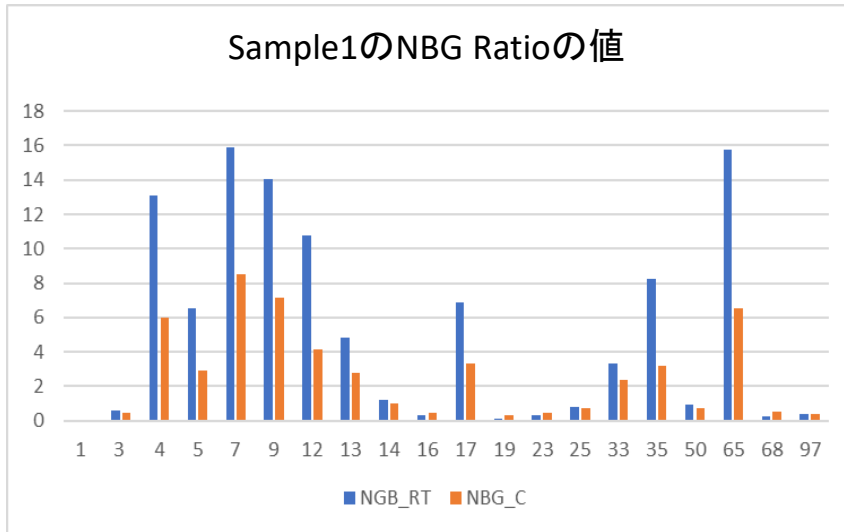
ドライボルテックス時間の影響



洗浄回数比較データ



WashBufferの温度の影響(LABScreen Mixedのデータ例)



冷蔵(4°C)と室温ではnMFI、NBG Ratio共に室温の方が高い
 →温度により影響を受けるので常に同じ条件のWashBufferの使用を推奨

LABScreen Mixedの解析

NC血清の確認

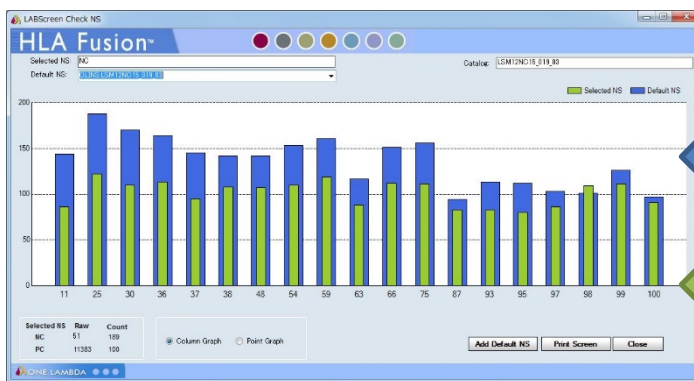
- LABScreen Single Antigenの場合

The screenshot displays the LABScreen software interface. At the top, there are fields for Lumindex, Session ID, File Path, Catalog ID, and Quantiplex Beads. Below these is a table with columns: Well, Sample, Sample Date, Sample Treatment, Sample Source, Dilute Factor, Secondary Ab, Lumindex Min Bead Cnt, NS, and Patient ID. The 'NS' column has a red box around it, and a red arrow points from a 'Check Control' button to this column. Below the table is a window titled 'LABScreen Check NS' showing 'HLA Fusion' results. The window includes a bar chart with 'Selected NS' (green) and 'Default NS' (blue) bars. A blue arrow labeled 'メーカーQC' points to the top of the chart, and a green arrow labeled '測定データ' points to the bars. At the bottom of the chart window, there is a table with columns: Selected NS, Raw, and Count.

Selected NS	Raw	Count
NC	36	146
PC	20621	124

NC血清の確認

- LABScreen Mixedの場合

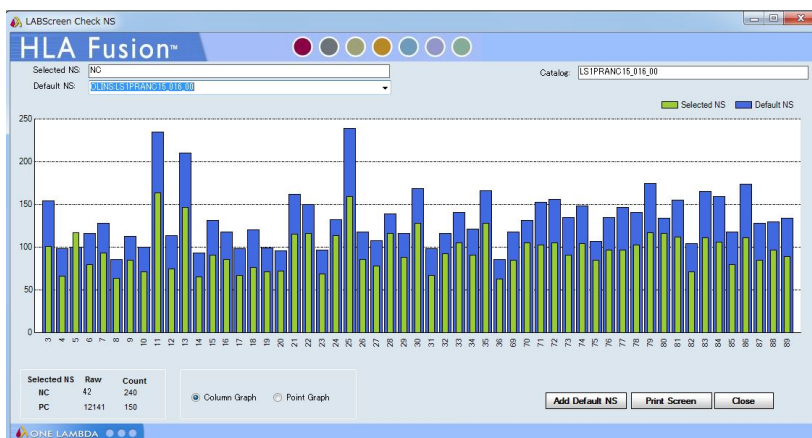


メーカーQCの値と比較して測定データが高い場合は、洗浄操作が不十分の可能性あります

メーカーQC

測定データ

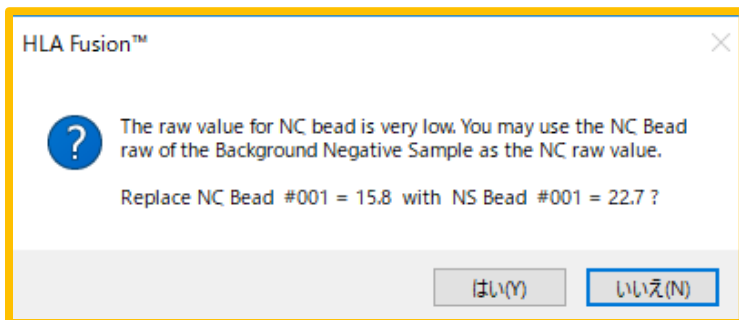
- LABScreen PRA Class I の場合



メーカーQC

測定データ

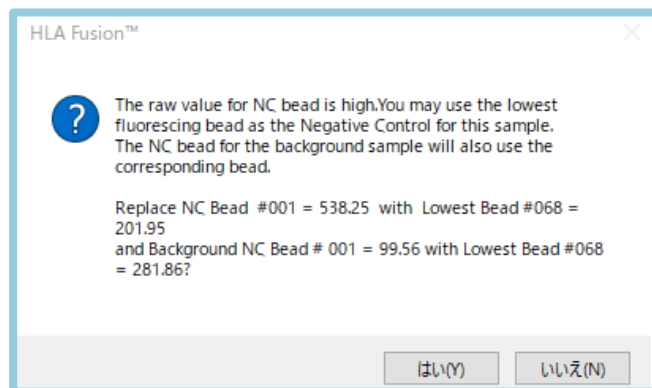
データのインポート時のメッセージ



検体のNCビーズが低いのでNC血清の数値と書き換えますか？

→「いいえ」を選択

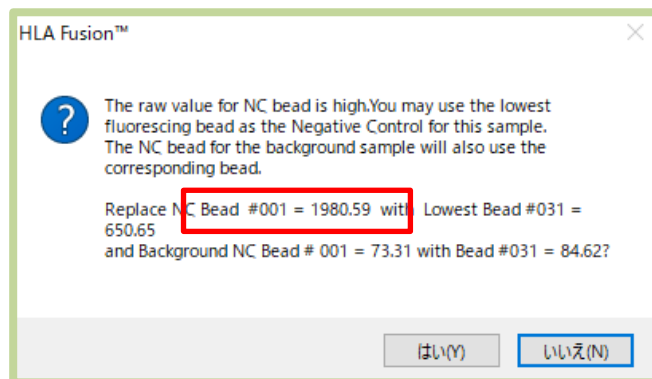
(検体のNC値がNC血清の値より低い時に表示されます。)



検体のNCビーズの値が高いので、検体のビーズの中の一番低い値と置き換えますか？

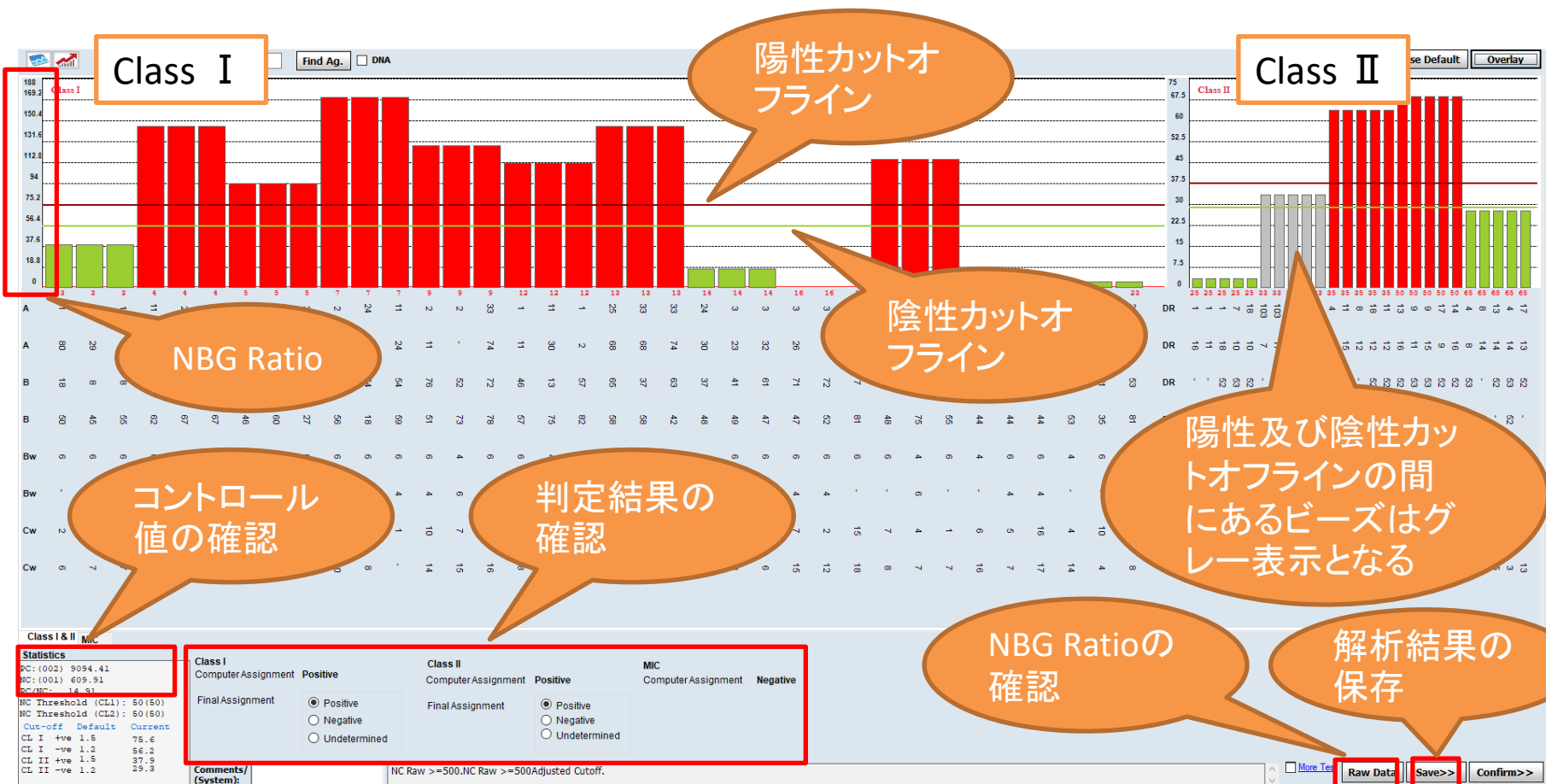
それに伴って、NC血清のNCビーズも変更しますか？

→「いいえ」を選択



検体のNCビーズ値が1500を超えている場合は再検査をしてください

解析画面



陽性及び陰性のカットオフラインは手動で上下に動かすことができます
判定結果はソフトが自動判定した結果が反映されますが、手動で変更できます

NBG Ratio

- NBG Ratio = Normalized Background Ratio
- 算出方法
 (検体の各ビーズ値-検体のNCビーズ)
 /(NC血清の各ビーズ値-NC血清のNCビーズ)

Bead ID	Class	Sample Raw	Sample NC	LSNS Raw	LSNS NC	NBG Ratio	Baseline	Rxn	Count	S1
001	NC	609.91	609.91	40.67	40.67	0	0		187	
002	PC	9094.41	609.91	9873.95	40.67	0.8628	0		160	
003	I	5545.42	609.91	166.77	40.67	39.1396	809.41	1	151	A1
003	I	5545.42	609.91	166.77	40.67	39.1396	809.41	1	151	A1
003	I	5545.42	609.91	166.77	40.67	39.1396	809.41	1	151	A1
004	I	15660.4	609.91	144.37	40.67	145.1349	4946.79	8	104	A2
004	I	15660.4	609.91	144.37	40.67	145.1349	4946.79	8	104	A2
004	I	15660.4	609.91	144.37	40.67	145.1349	4946.79	8	104	A1
005	I	14819.17	609.91	192.34	40.67	93.6854	4057.59	8	124	A2
005	I	14819.17	609.91	192.34	40.67	93.6854	4057.59	8	124	A1
005	I	14819.17	609.91	192.34	40.67	93.6854	4057.59	8	124	A2
007	I	16885.34	609.91	135.66	40.67	171.3383	6180.44	8	108	A2
007	I	16885.34	609.91	135.66	40.67	171.3383	6180.44	8	108	A2
007	I	16885.34	609.91	135.66	40.67	171.3383	6180.44	8	108	A1
009	I	16417.99	609.91	164.23	40.67	127.9385	5684.52	8	115	A2
009	I	16417.99	609.91	164.23	40.67	127.9385	5684.52	8	115	A2

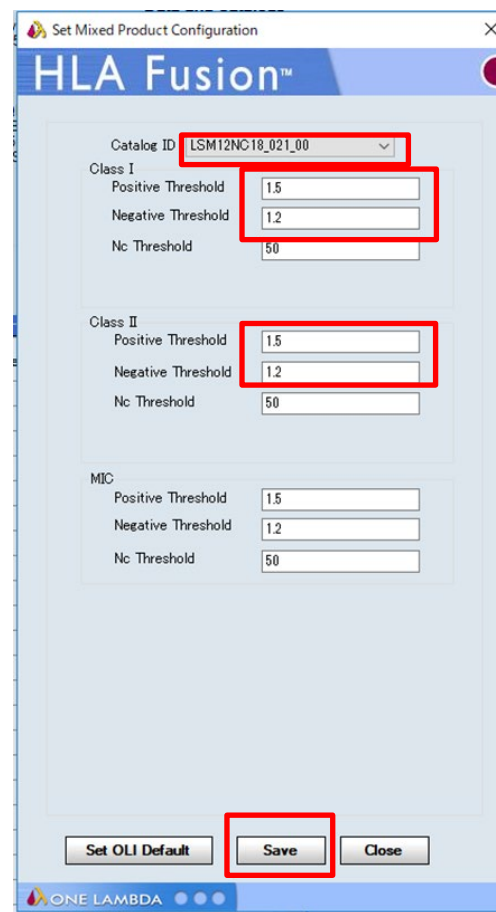
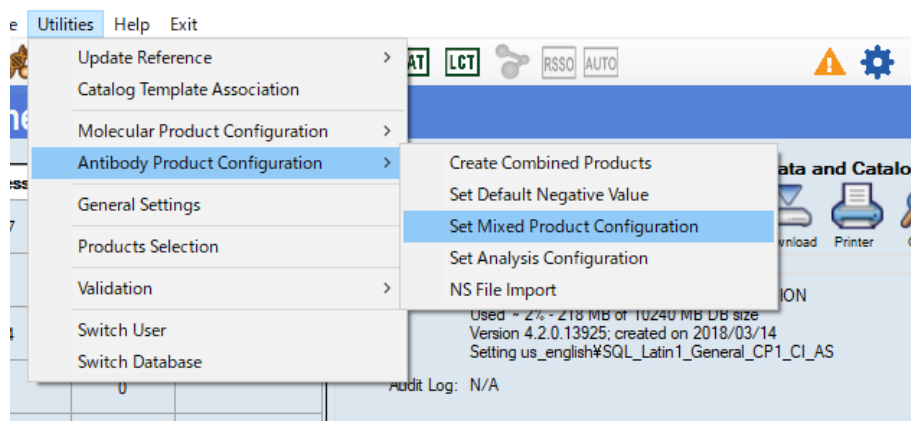
各検体の解析画面の右下にある「Raw Data」をクリックすると表示されます

判定方法

- NBG Ratioの値を使用して判定する
 - 陽性:陽性カットオフ値以上のビーズが1つでもある場合
 - 陰性:全てのビーズが陰性カットオフ値以下
- クラス1、クラス2のそれぞれを陰性/陽性と判定するための試薬ですので、抗原ごとの判定に用いないでください(A2が陽性など)
- カットオフ値の初期設定は陽性1.5、陰性1.2となっておりますが、ソフトのデフォルト設定値です
 - 必要に応じて、各施設様での検討、設定をお願いします
 - ソフトはカットオフ値を2つ設定できるようになっておりますが、必ずしも2つの値を設定する必要はありません

カットオフ値の変更

Utilities > Antibody Product Configuration > Set Mixed Product Configuration



左の画面が開きますので、Catalog IDよりカタログを選択し、NBG Ratio値を変更後、最後に「save」を押します。

* カタログごとに変更が必要です *

レポート-1



Analyze Data **Reports** Data Sample Patient Info Profile Utilities Help Exit

Patient Generic Typing LABType MicroSSP Generic Antibody LABScreen Specialty Statistical Miscellaneous

Patient or Donor ID: *
 Session: *
 Batch: *
 Sample ID: *

Sample Summary LSM Details
 LSM Summary
 LSM Overview

LSM Detail

Approved By: _____ Date: _____

Session ID: 200907_LSM022_NC023_20200907_124154
 Catalog: LSM12NC23_022_00

NS Sample: NC

Background Values

005	121.21	007	132.31	008	129.79	013	114.74	018	128.56	030	129.09	041	123.49	043	133.09	053	133.52	059	126.96
061	128.84	062	143.13	078	92	081	109.28	083	107.59	084	66.02	096	95.5	099	90.6	100	90.09	NC	114.76

PC: 1212247

Class I Positive Cutoff: 1.5 Negative Cutoff: 1.2 NC Threshold: 50 Class I Sensitivity/MFI: 0
 Class II Positive Cutoff: 1.5 Negative Cutoff: 1.2 NC Threshold: 50 Class II Sensitivity/MFI: 0
 MIC Positive Cutoff: 1.5 Negative Cutoff: 1.2 NC Threshold: 50 HNA Sensitivity/MFI: 0

Patient ID: _____ Patient Name: _____ Local ID: _____

Status: _____ Transplant Type: _____

Class I						Class II					
Overall	Bead	Result	Raw Data	Ratio	Count	Overall	Bead	Result	Raw Data	Ratio	Count
Positive	005	Positive	831.5	16.21	112	Positive	078	Undetermined	95.78	1.49	157
	007	Positive	977.6	19.13	192		081	Positive	232.02	4.22	163
	008	Positive	622.27	12.02	147		083	Negative	68.14	0.94	155
	013	Positive	849.77	16.57	101		084	Positive	137.78	2.33	152
	018	Positive	951.22	18.60	100		096	Negative	75.5	1.09	151
	030	Positive	775.82	15.09	148						
	041	Positive	703.83	13.65	169						
	043	Positive	885.08	17.28	162						
	053	Positive	706.84	13.71	197						
	059	Positive	698.43	13.55	142						
	061	Positive	650.73	12.59	159						
	062	Positive	942.17	18.42	184						











[2(1,B1)] FL1-64
 Sample Date: NC 21.16 168
 PC 9278.56 148
 PCNC Ratio 438.5

Sec. Ab: _____ Treatment: _____
 Saved By: 1,1 Saved Date: 11/22/2020
 Confirmed By: _____ Confirmed Date: _____

全てのビーズのNBG Ratioやビーズカウントの値が表示される

レポート-2

Analyze Data **Reports** Data Sample Patient Info Profile Utilities Help Exit

Patient Generic Typing LABType MicroSSP Generic Antibody LABScreen Specialty Statistic
Sample Summary LSM Details LSM Summary LSM Overview

Patient or Donor ID: *
 Session: *
 Batch: *
 Sample ID: *

LSM Summary

Session ID: 200907_LSM022_NC023_20200907_124154
 Catalog ID: LSM12NC23_022_00

NS Sample: NC

Background Values

005	121.21	007	132.31	008	129.79	013	114.74	018	128.56	030	129.09	041	123.49	043	133.09	053	133.52	059	126.96
061	128.84	062	143.13	078	92	081	109.28	083	107.59	084	66.02	096	95.5	099	90.6	100	90.09	NC	114.76

PC: 1212247

Class I	Positive Cutoff: 1.5	Negative Cutoff: 1.2	NC Threshold: 50	Class I	Sensitivity/MFI: 0
Class II	Positive Cutoff: 1.5	Negative Cutoff: 1.2	NC Threshold: 50	Class II	Sensitivity/MFI: 0
MIC	Positive Cutoff: 1.5	Negative Cutoff: 1.2	NC Threshold: 50	HNA	Sensitivity/MFI: 0

[WellPosition]	Sample ID	Class I	Class II	MIC	←-NC-→		←-PC-→		
		Raw	Count	Raw	Count	Raw	Count	PC/NC	
[2(1,B)]	FL1-64	Positive	Positive	Negative	21.16	168	9278.56	148	438.5

Patient ID: _____ Patient Name
 Sec. Ab: _____ Treatment
 Saved By: 1,1 Saved Date: 11/22/2020
 Confirmed By: _____ Confirmed Date: _____ Sample Date
 Comment:
 User Comment:

1,1

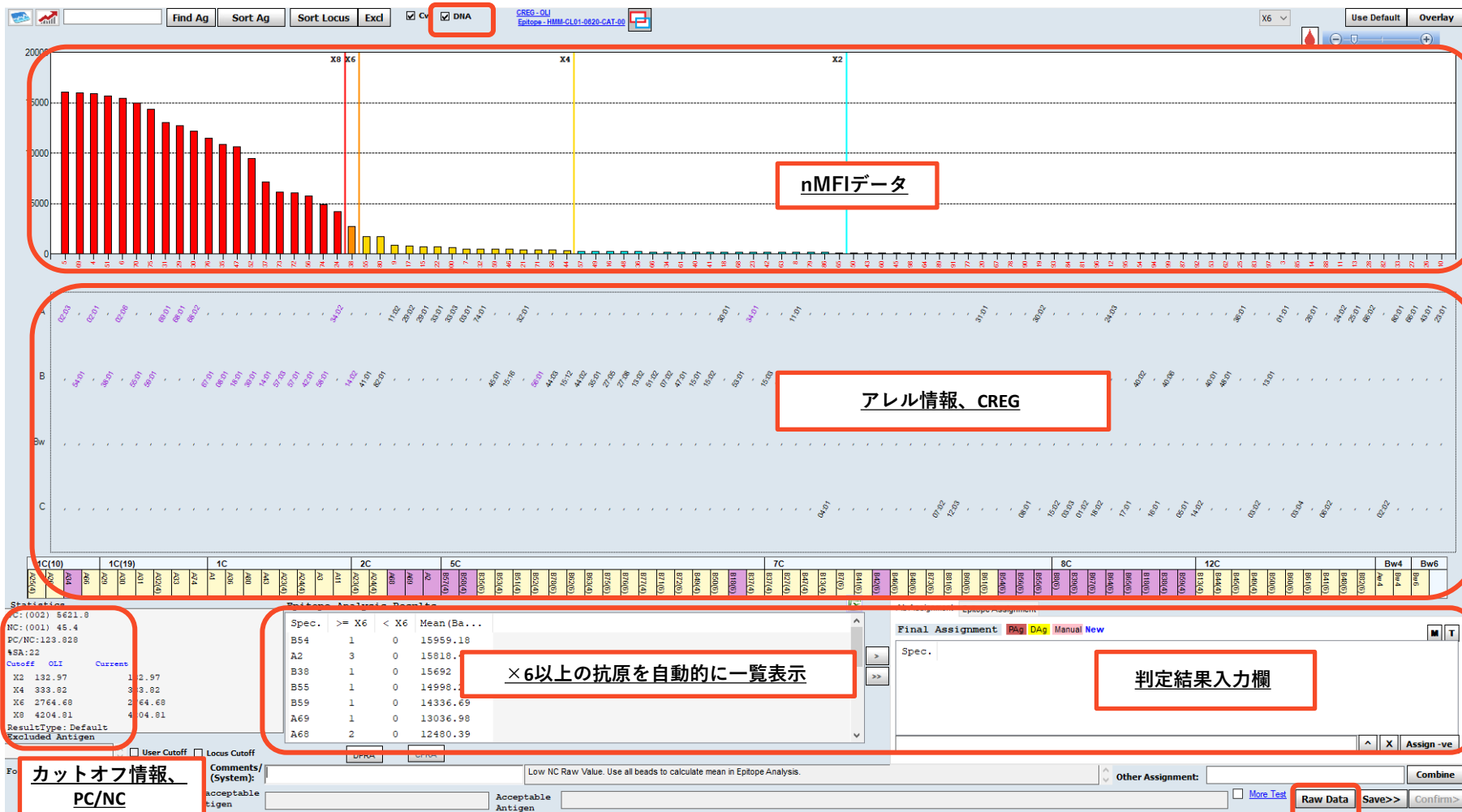
11/22/2020 HLA Fusion™ 4.4.0.13925 Page 1 of 1

陽性/陰性の結果のみ表示される

LABScreen Single Antigenの解析

解析画面-1

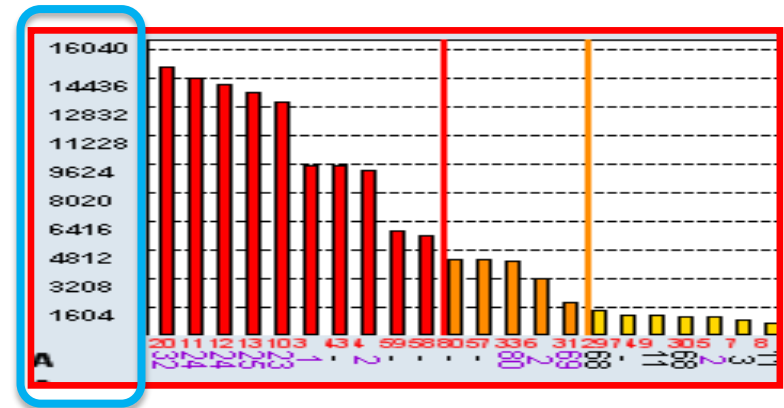
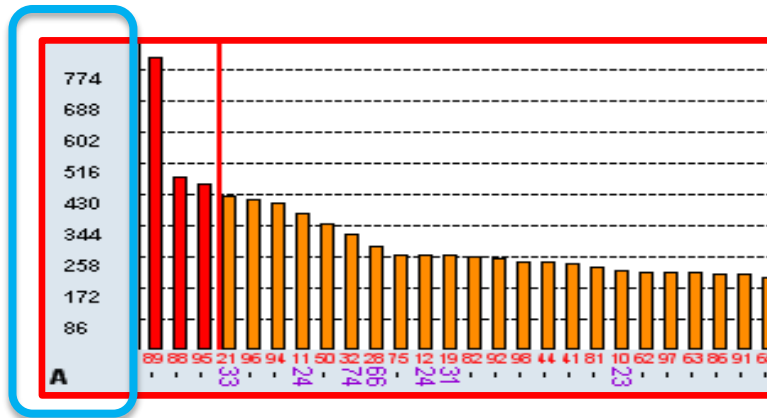
2桁、4桁表示の切り替え



nMFIの確認

自動判定

- HLA Fusionでは自動判定により、x8、x6、x4、x2を決定する
- デフォルトではx6以上が陽性となるように設定されている
- 同じ判定結果でも蛍光値は全く異なるため、判定の際はnMFIの値も必ず確認することが必要

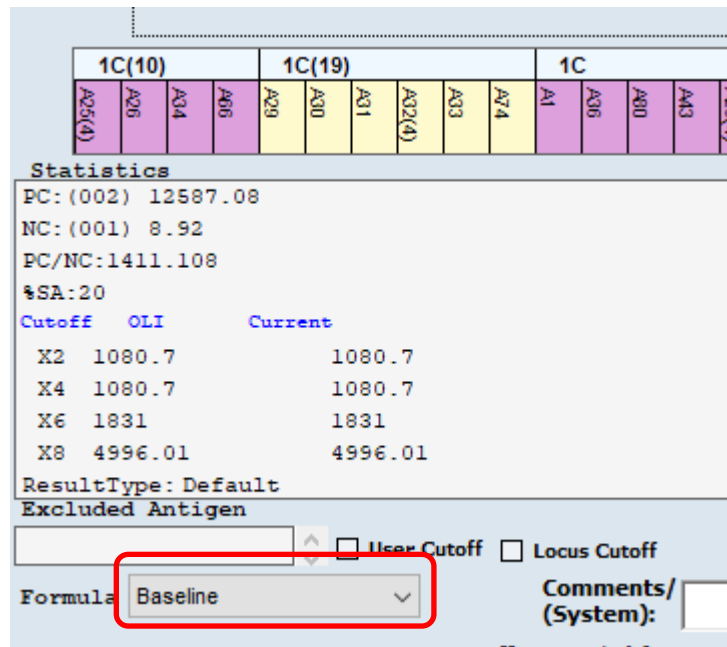


- x8 : 70%(1番MFIが高い検体を基準に算出)
- x6 : 30%
- x4 : 15%
- x2 : 10%

CREGとショルダー(前後のビーズとのnMFI値の差)も加味して判定される

nMFIとは

- nMFI = normalized Mean Fluorescence Intensity
 - LABScreenではTrimmed Meanの値をnMFIとして採用
- HLA Fusion上ではBaselineとして表示



Statistics

PC: (002) 12587.08
 NC: (001) 8.92
 PC/NC: 1411.108
 %SA: 20

Cutoff	OLI	Current
X2	1080.7	1080.7
X4	1080.7	1080.7
X6	1831	1831
X8	4996.01	4996.01

ResultType: Default
 Excluded Antigen

Formula: **Baseline**

Bead ID	Sample Raw	Sample NC	LSNS Raw	LSNS NC	Baseline	NBG Ratio	Rxn
001	8.92	8.92	100	100	0	1	NC
002	12587.08	8.92	12966	100	0	10.88	PC
003	21706.26	8.92	93	100	21697.34	2616.6	8
004	68.88	8.92	85	100	59.96	9.08	1
005	51.32	8.92	73	100	42.4	7.88	1
006	91.56	8.92	113	100	69.64	9.08	1
007	32.35	8.92	80	100	23.43	4.53	1
008	6705.76	8.92	64	100	6696.84	1174.64	8
009	5369.77	8.92	162	100	5298.85	371.6	8
010	12402.76	8.92	147	100	12346.84	945.88	8
011	10979.8	8.92	116	100	10954.88	1061.14	8

nMFIの計算式

- 計算式

$$\text{nMFI} = (\text{検体の各ビーズ値} - \text{検体のNCビーズ}) - (\text{NC血清の各ビーズ値} - \text{NC血清のNCビーズ})$$

Bead ID	Sample Raw	Sample NC	LSNS Raw	LSNS NC	Baseline	NBG Ratio	Rxn	Count
077	17810.08	319.22	155.32	21.77	17357.31	7.82	8	142
028	16957.76	319.22	84.86	21.77	16575.45	13.63	8	140

nMFI

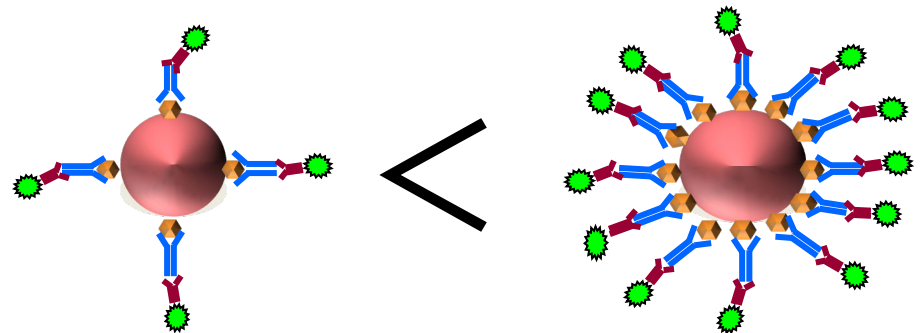
- (検体の各ビーズ値-検体のNCビーズ)
→(各検体におけるバックグラウンド除去)
- (NC血清の各ビーズ値 - NC血清のNCビーズ)
→(各ビーズのバックグラウンド除去)

nMFIの比較

- nMFIはOne Lambda独自の値です
- **他の試薬とnMFIでの比較はできません**

何故？

- ビーズ上についているHLA抗原に対する抗体の親和性の違い
- ビーズ上についているHLA抗原の量の違い
- 二次抗体濃度の違い

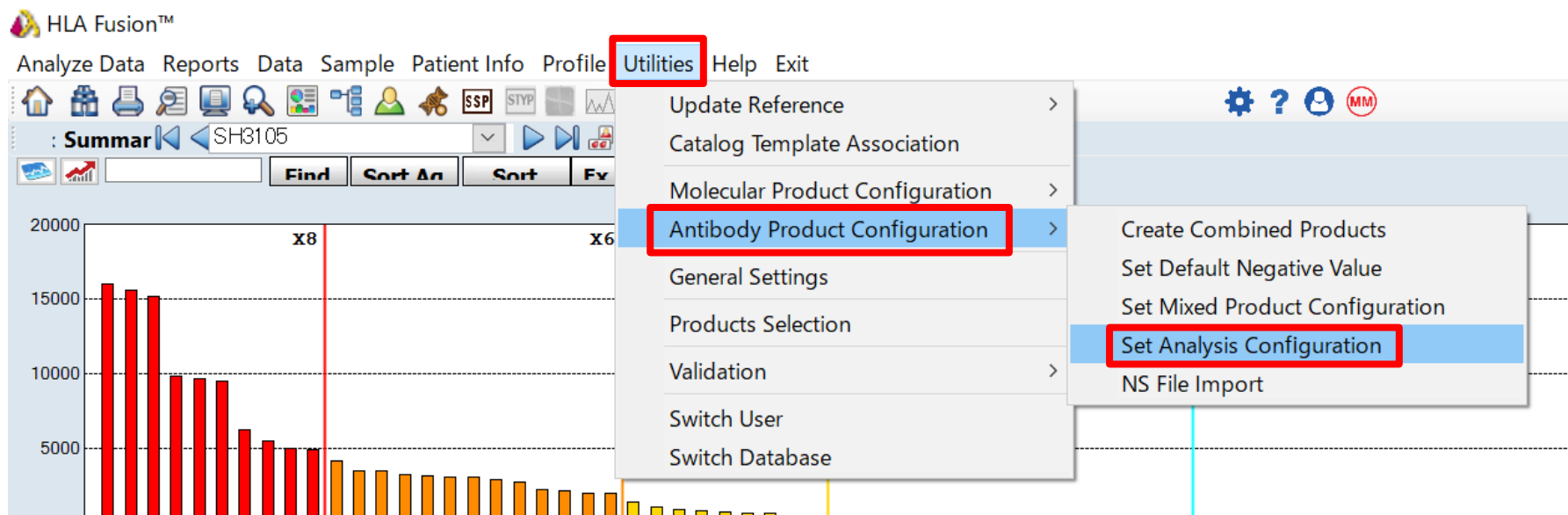


判定方法

- LABScreen Single Antigenには明確なカットオフが設定されていません
- 使用目的に応じて結果の解釈や治療方針等は異なるため、メーカーとして陽性/陰性の基準をお伝えすることができません
 - 定量試薬ではありませんが、nMFIの値は抗体価の指標としてお使いいただくことは可能です
- 必ず各施設で判定基準・判定ルールを作成して下さい

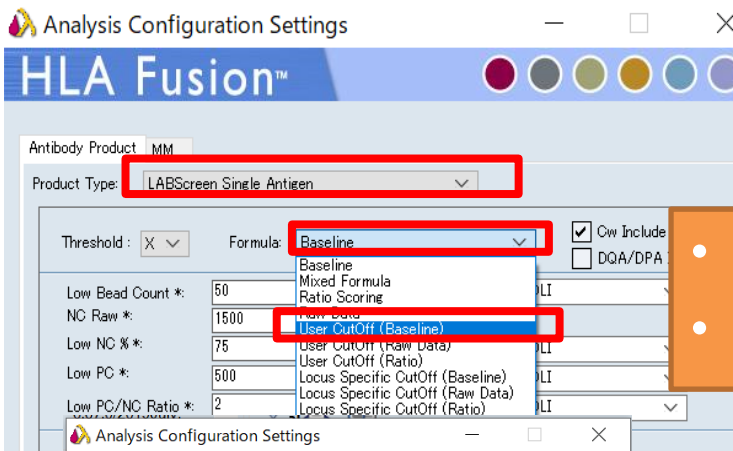
カットオフ値の変更方法

下記の手順でカットオフ値の変更ができます

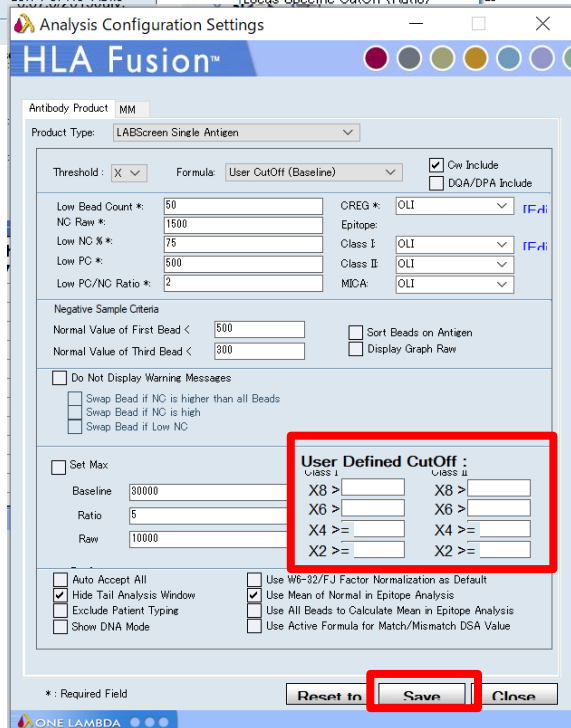


Utilities → Antibody Product Configuration
→ Set Analysis Configurationの順にクリック

カットオフ値の変更方法



- Product TypeはLABScreen Single Antigenを選択
- FormulaはUser Cutoff(Baseline)を選択

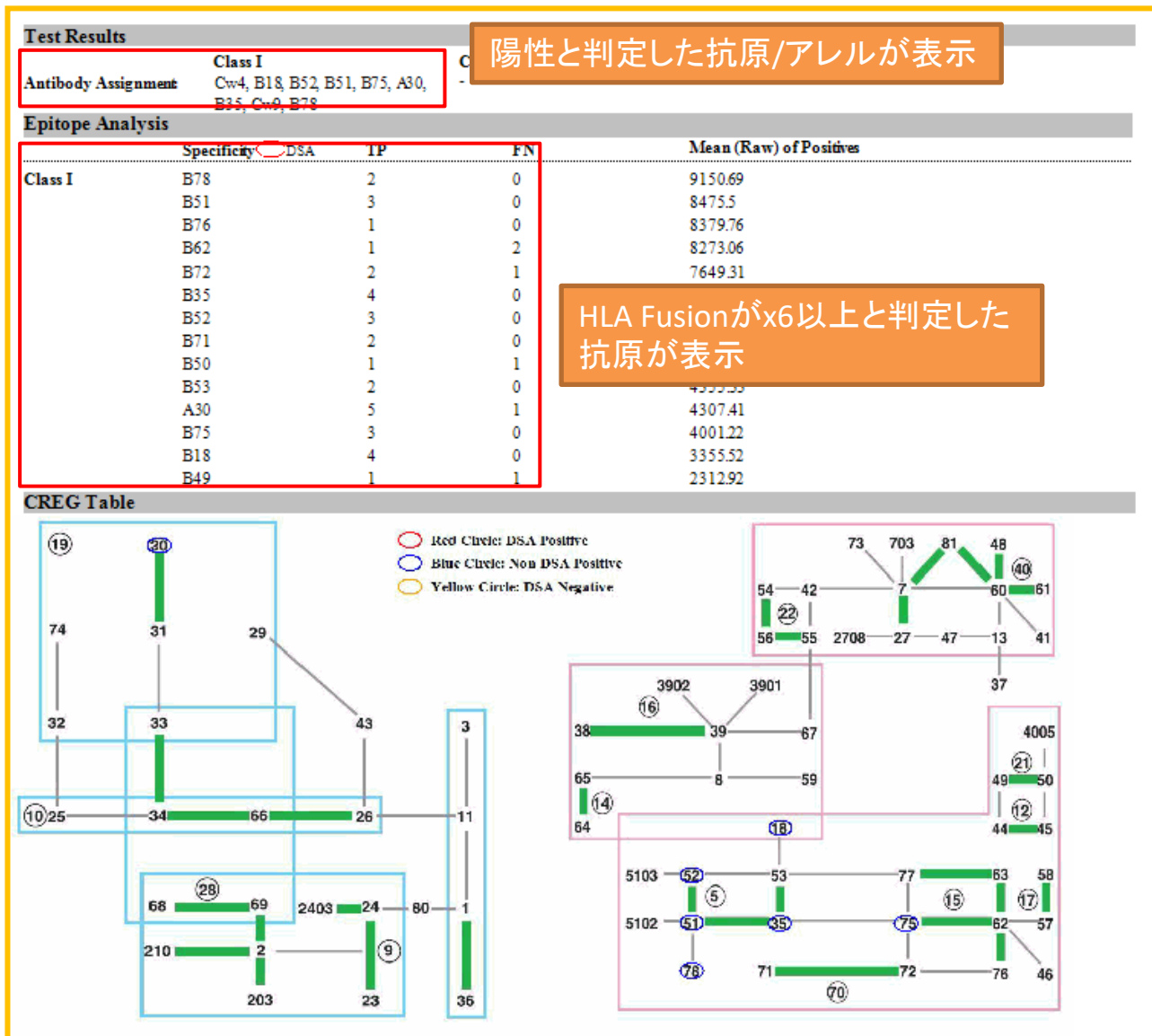


- Threshold「x6」以上が陽性ですので、「X6>」の横にカットオフ値の入力をしてください
- 左側がクラス I、右側がクラス II の入力欄です
- 「x8」～「x2」の全ての項目に数値を入力しないと保存ができません
- 数値の入力完了後、saveを押して保存します

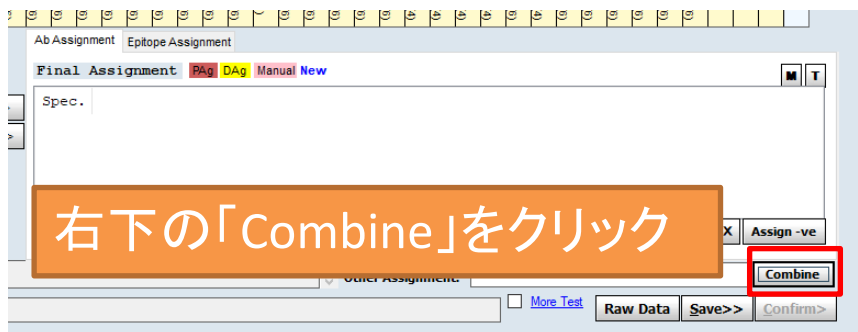
レポートの作成

The screenshot displays the Veritas software interface. The 'Reports' menu is highlighted in the top navigation bar. A dropdown menu is open, showing options: 'Antibody Custom', 'Antibody Screening/Identification', 'Antibody Screening Results', and 'Single Antigen Report'. The 'Antibody Custom' option is selected. Below this, the 'Custom Antibody Screening Report Setup' dialog box is open, titled 'HLA Fusion™'. The dialog box contains various sections for configuring the report, including 'Patient Information', 'Test Configuration', 'Tail Analysis Results', 'Overall Results/Assignments', 'Epitope Analysis Results', 'Test and Catalog Details', and 'Sample Information'. Each section has a 'Check All' and 'Uncheck All' button. The 'Setup' button in the top right corner of the dialog box is highlighted with a red box. An orange callout box at the bottom right of the dialog box contains the text: 'レポートに出力する項目を選択' (Select items to output to the report).

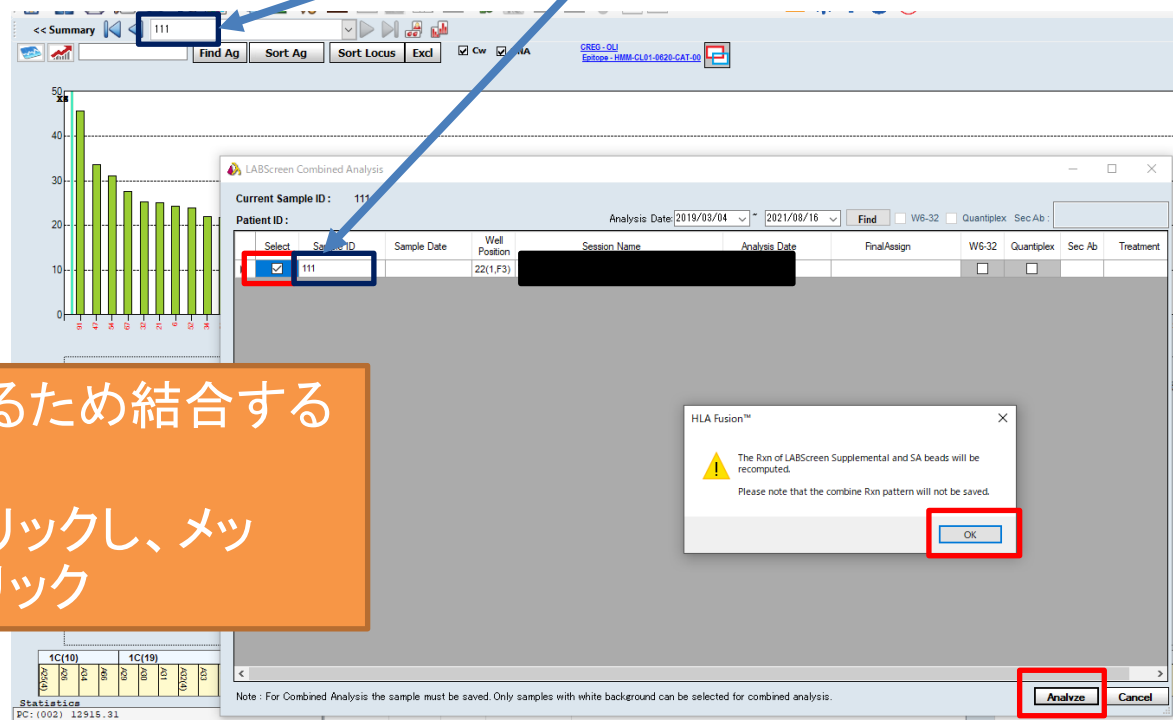
レポート例



Single AntigenとSupplementのデータの結合



Sample名が同じデータのみ結合可能



別の画面が立ち上がるため結合するデータに☑を入れる
右下の「Analyze」をクリックし、メッセージ画面のOKをクリック

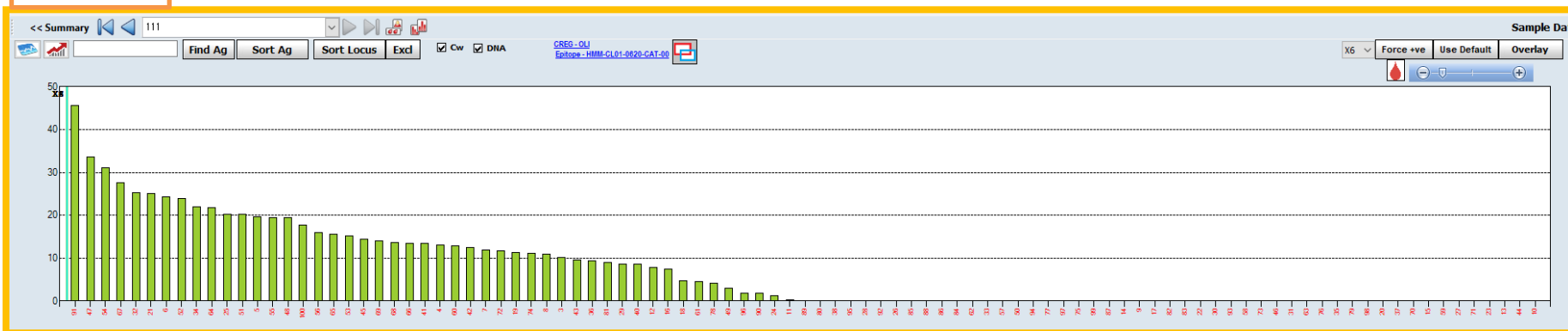
1C(10)	1C(19)
007	007
008	008
009	009
010	010
011	011
012	012
013	013
014	014
015	015
016	016
017	017
018	018
019	019
020	020

Note: For Combined Analysis the sample must be saved. Only samples with white background can be selected for combined analysis.

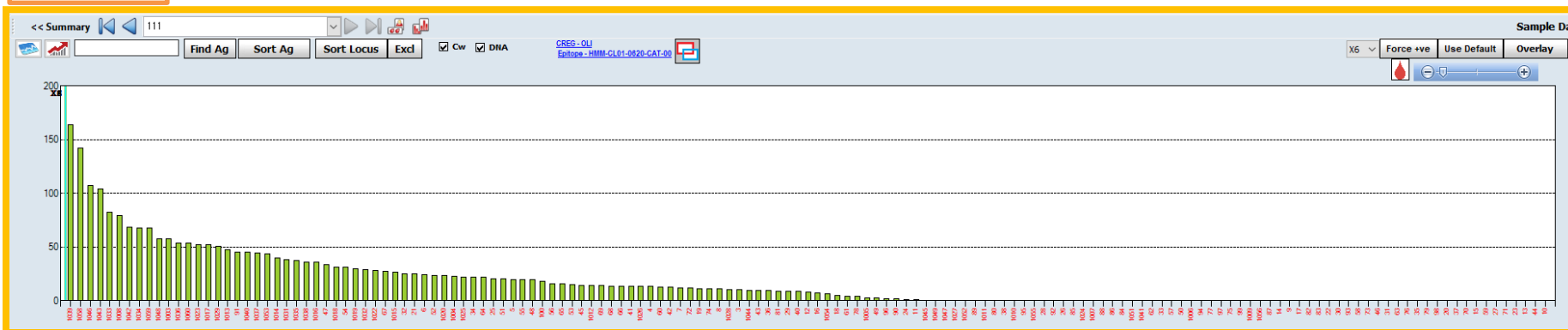
Single AntigenとSupplementのデータの結合



結合前

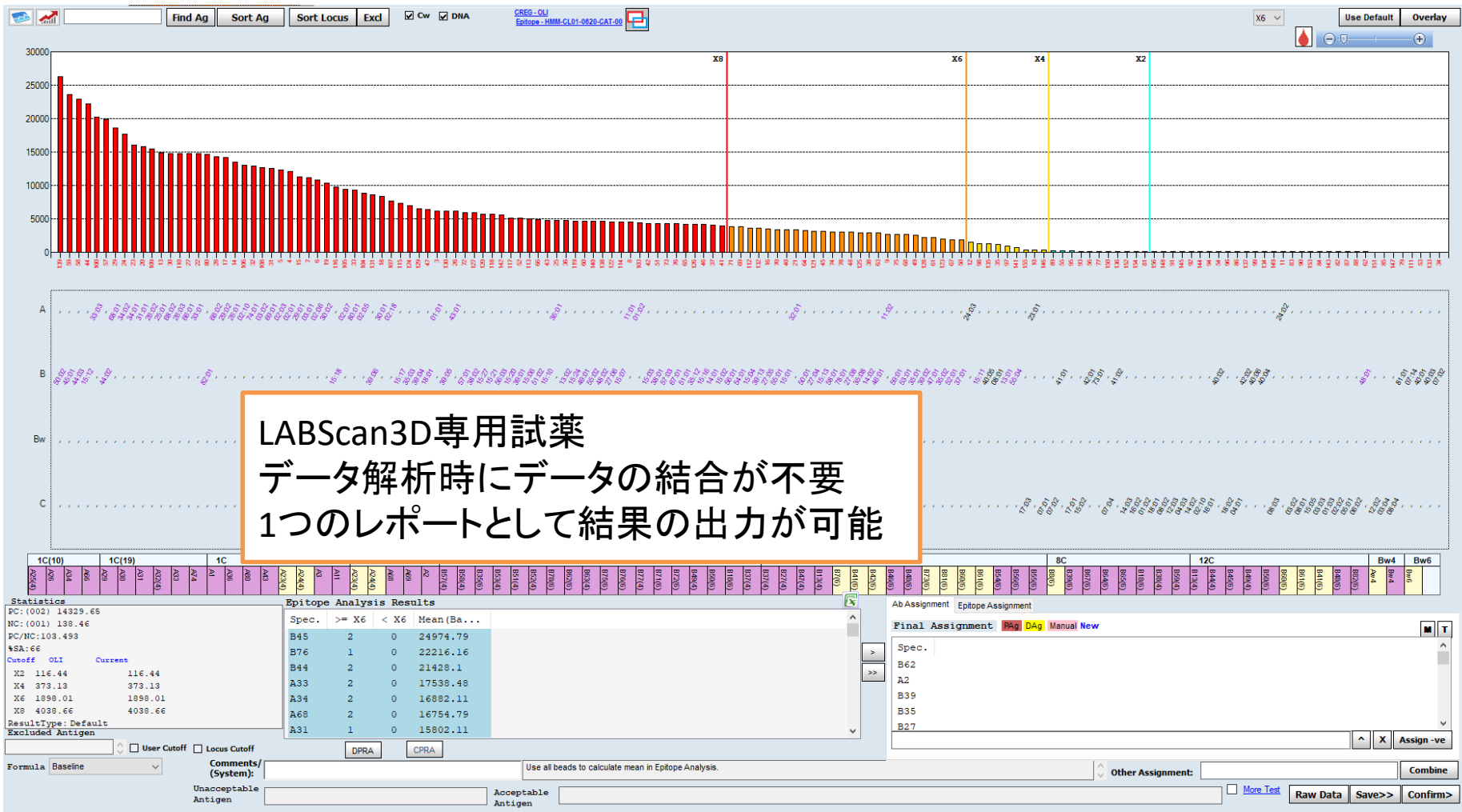


結合後



結合したデータの保存及びレポートの出力はできません

LABScreen Single Antigen ExPlex



HLA Fusionの解析機能

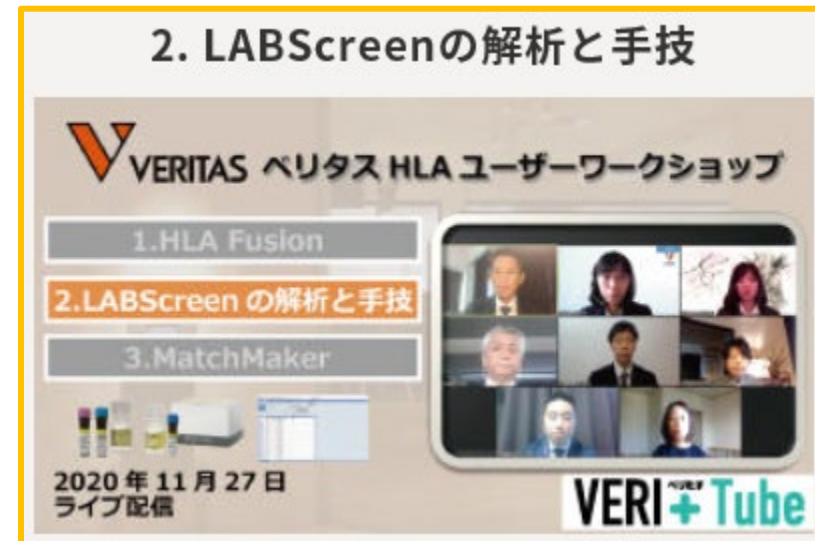
- HLA Fusion の解析機能は昨年開催いたしましたワークショップで紹介しておりますので是非ご覧ください
 - https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/2020hlaws_abscreen.html

1. HLA Fusion



HLA Fusionの基礎
データベースの作成、解析に必要なファイルの
インポート方法など

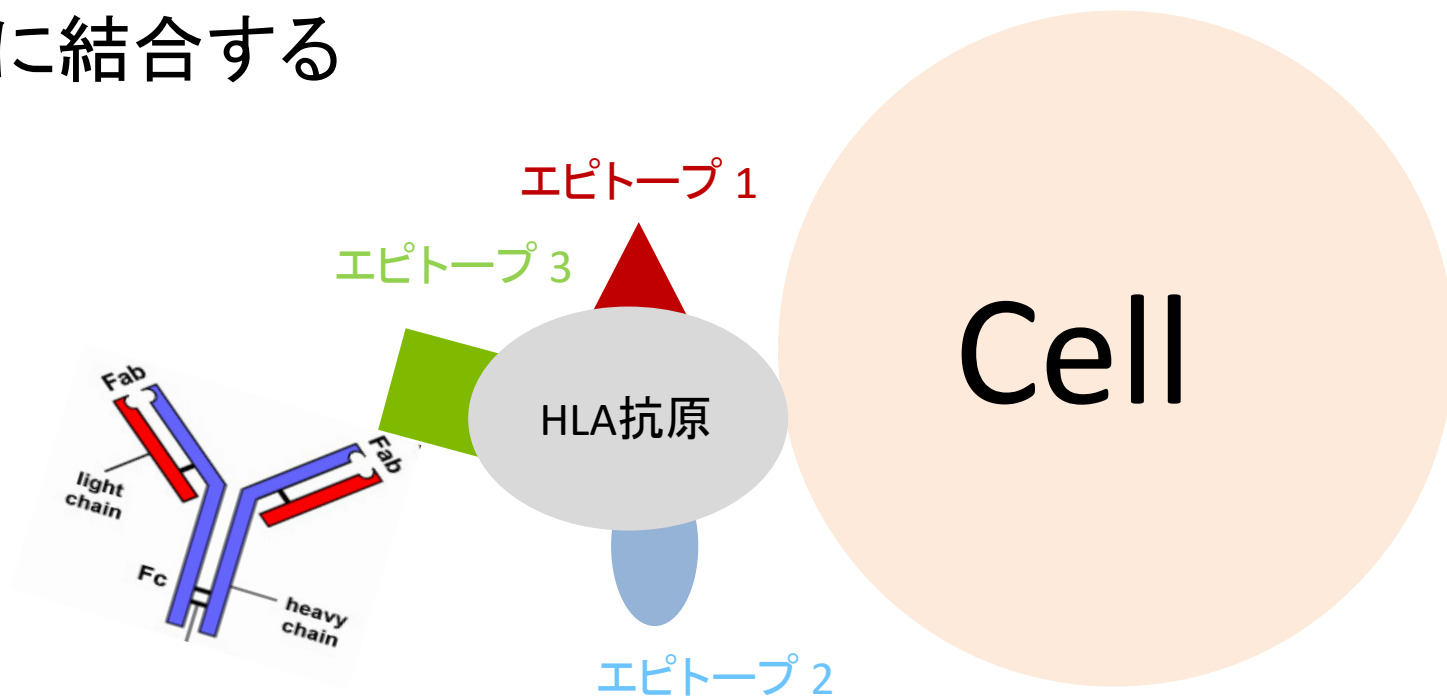
2. LABScreenの解析と手技



LABScreenの解析時に使用できる機能の紹介

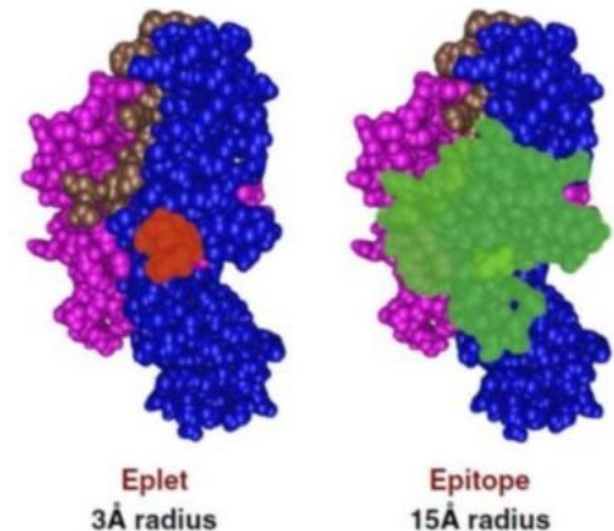
生体内での抗HLA抗体の反応

- 抗HLA抗体はHLA抗原の特異的な構造(エピトープ)に対して産生される
- HLA抗原に結合するのではなく、エピトープに特異的に結合する



Epitope (エピトープ) と Eplet (エプレット)

- 抗体は抗原分子の全体と結合するのではなく、抗原上の数個のアミノ酸を認識して結合
- 特定のアミノ酸配列を中心に、半径15 Å (オームストロング) 内で定義される抗原上の抗体認識部位をエピトープと呼ぶ
 - Functional Epitope (機能的エピトープ) と Structural Epitope (構造エピトープ) に分類される
- HLA 抗原表面上のアミノ酸の3 Å (オームストロング) 程度の範囲内のアミノ酸が Eplet となる
 - Functional Epitope と Eplet はほぼ同じと考えられる
- HLA は異なる抗原で共通するアミノ酸配列を保有するため、一つの抗体が複数の抗原と反応する



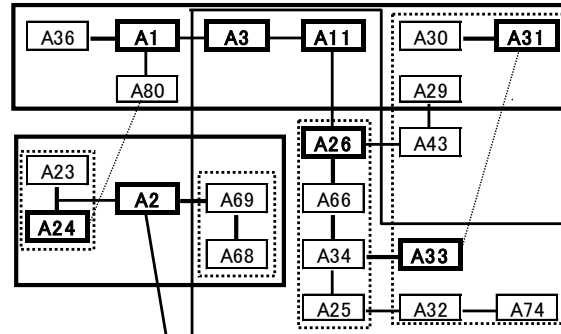
CREG (Cross Reactive Group)

実際に見つかった抗血清の特異性

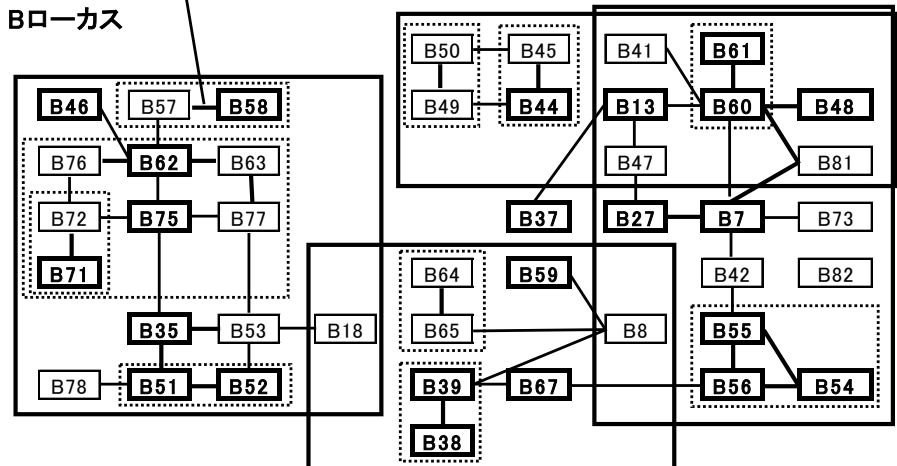
- A1+A36
- A1+A36+A80+A2
- 3+A24
- A3+A11
- A30+A31
- A31+A33
- A2+A24
- A2+A68+A69
- A2+B57+B58
- B62+B75
- B62+B57
- B35+51+B53
- B51+B52
- B38+B39+B67
- B44+B45
- B7+B27
- B7+B60+B48
- B60+B61+B13
- B54+B55
- B55+B56 etc.



Aローカス



Bローカス



* Nakajima F. *MHC* Vol.13, No2: 2006

1C(10)		1C(19)				1C					2C											
A25(4)	A26	A34	A66	A29	A30	A31	A32(4)	A33	A74	A1	A36	A80	A43	A23(4)	A24(4)	A3	A11	A23(4)	A24(4)	A68	A69	A2

CREG

交差反応性グループ

vs

Epitope

抗原決定基

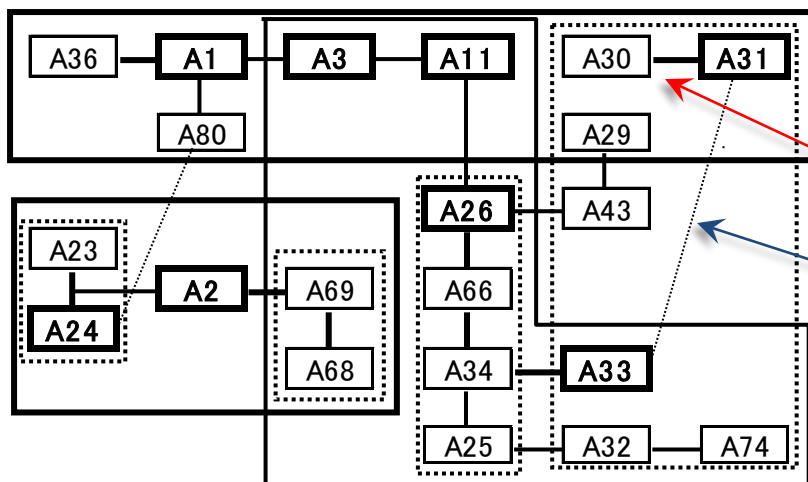


抗体特異性に基づく抗原の分類で、抗原をグループ化して類似性を図式化したもの

抗原のアミノ酸配列に基づく抗体認識部位の分類で、アミノ酸の位置と種類で示す

- 抗体の反応性に基づく分類 ↔ 抗原の設計図に基づく分類
- 旧来からの経験則 ↔ HLA遺伝子解析で明確化
- 実際の反応 ↔ 反応の予測
- 説明のつかない反応もある ↔ 予測どおりに反応しない場合もある

Aローカス



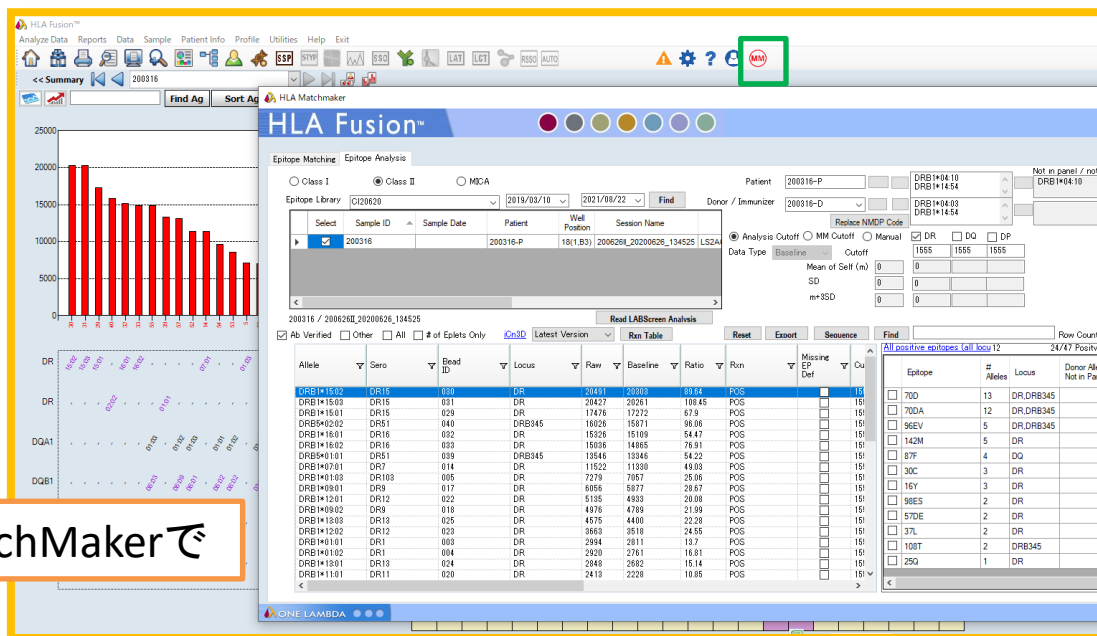
HLA allele	$\alpha 1$ -domain
Position	1112333333344445555666677777788889 37917940123456134824623567034678901230
Consensus	HYFSREADTQFVRF AQRRIQGQERNVHTDVDLGTLRGA
HLA-A*01:01	-----K-----M--AN-----D
HLA-A*02:01	-----G-K-H-----
HLA-A*11:01	--Y-----Q-----D
HLA-A*24:02	--S-----E-GK--EN-RIALR--
HLA-A*26:01	--Y-----RN-----AN-----D
HLA-A*30:01	--S-S-----R-----Q-----
HLA-A*31:01	--T-----R-----I-----
HLA-A*33:03	--T-----RN-----I-----

* Nakajima F. MHC Vol.13, No2: 2006(一部改変)

56R 73I

抗HLA抗体検査の結果解析への応用

- Single Antigen試薬に含まれていないアレルがDSAであった場合にDSAの産生の予測をすることができる
 - 抗体産生の対象となっているエピトープを推測
 - エピトープがDSAであるアレルに含まれているか否かを確認
 - 含まれている場合は、DSAが陽性である可能性が高い



エピトープ解析はMatchMakerで

MatchMaker

- MatchMaker の機能は昨年開催いたしましたワークショップで紹介しておりますので是非ご覧ください
 - https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/2020hlaws_matchmaker.html



3. MatchMaker

VERITAS ベリタス HLA ユーザーワークショップ

1. HLA Fusion

2. LABScreen の解析と手技

3. MatchMaker

2020年11月27日
ライブ配信

VERI+Tube

The image shows a screenshot of a webinar interface. At the top, it says '3. MatchMaker'. Below that is the title 'VERITAS ベリタス HLA ユーザーワークショップ'. There are three menu items: '1. HLA Fusion', '2. LABScreen の解析と手技', and '3. MatchMaker' (which is highlighted in orange). To the right of the menu is a video grid showing several participants. At the bottom left, it says '2020年11月27日 ライブ配信'. At the bottom right, there is a logo for 'VERI+Tube'.

検体の前処理

なぜ検体の前処理を行うのか

- NCBーズ、PCBーズの値は検体の状態に影響を受ける
 - NCBーズ:再検査基準は1500以下であること
 - NBG RatioやnMFIの値の算出に使用されるため、できるだけ低くすることが大切
 - 抗HLA抗体以外の物質の影響でNCBーズは高くなる
 - PCBーズ:再検査基準は500以上であること
 - 低い場合は偽陰性(本来存在する抗HLA抗体がビーズに結合していない可能性)となる場合がある
 - 補体活性が高いことやIgMが含まれることが低くなる原因になる

方法(赤字は実施を推奨)	目的	結果に与える影響
凍結融解、Adsorb Out、FBS、超高速遠心	非特異タンパクを取り除く	NCBーズの値を下げる
EDTA	補体活性型抗体の影響を取り除く	PCBーズの値を上げる
DTT	IgMの影響を取り除く	PCBーズの値を上げる

凍結融解→遠心(必ず行う)

- 背景
 - 患者血清・血漿中には不純物が含まれる
- 操作方法
 - 血清・血漿の凍結
 - 最短で-70°C以下、15分で凍結
 - 確実に凍結することが重要(推奨の温度や時間はない)
 - 解凍後遠心(8,000~10,000G、10分間以上)
 - 遠心後、中間層より検体を回収する
- 注意点
 - 高速回転の遠心機を使用するとなお良い
 - 不純物が多い検体は、遠心速度、時間を増やす



Adsorb Out (One Lambda推奨)

- 背景

- ラテックスに対する非特異な抗体をもつ検体は、バックグラウンドが高くなる(=検体のNCビーズが高くなる)ことがある
- ラテックス抗体を吸着するビーズ試薬

- 注意点

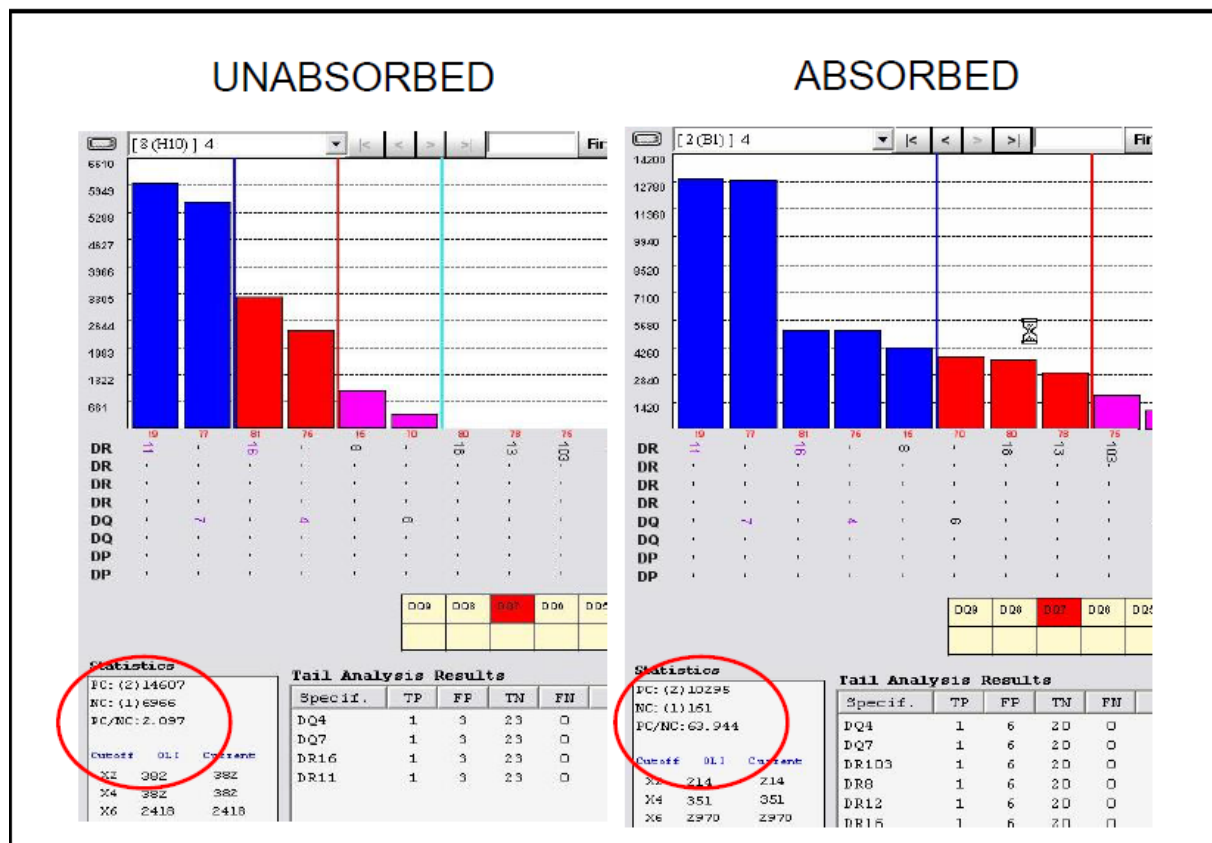
- 70-80%の検体で有効であると考えられている
- 複数回行くと抗HLA抗体も吸着され抗体価が減少することがあるので注意(3回程度が限度)
- 検体によって処理をすることでNCビーズが上がる場合もある

- 操作方法

- Adsorb Outビーズをボルテックス
- 検体血清30 μ LにAdsorb Outビーズ3 μ L加えボルテックス
- 室温で30分間、振とうさせながらインキュベート
- 15,000rpmで5分間遠心
- 上清を新しいチューブに回収
 - チューブ底のAdsorb Outビーズを吸わないように注意
 - 使用したビーズは再利用不可
 - Adsorb Outビーズが混入した場合は、再度遠心して上清を回収

Adsorb Out データ例

LABScreen Single Antigen Class II



- 吸収前
 PCビーズ: 14607
 NCビーズ: 6966
 PC/NC 比: 2.097

- 吸収後
 PCビーズ: 10295
 NCビーズ: 161
 PC/NC 比: 63.944

データ: One Lambda

Adsorb Outを繰り返した時の蛍光値

	Neat	1x ADS	2x ADS	3x ADS	4x ADS
NCビーズ	4451	804	579	538	471
PCビーズ	7516	5115	3508	3833	3935
PC/NC Ratio	1.7	6.4	6.1	7.1	8.4
抗体価の高いビーズ	19, 4, 18, 75, 91, 23, 69, 15	19, 4, 18, 75, 91, 23, 15, 81	19, 4, 75, 91, 23, 15, 81, 69	19, 4, 75, 91, 18, 23, 69, 17	19, 4, 75, 18, 91, 23, 69, 17

減弱した抗体

データ: One Lambda

- 背景

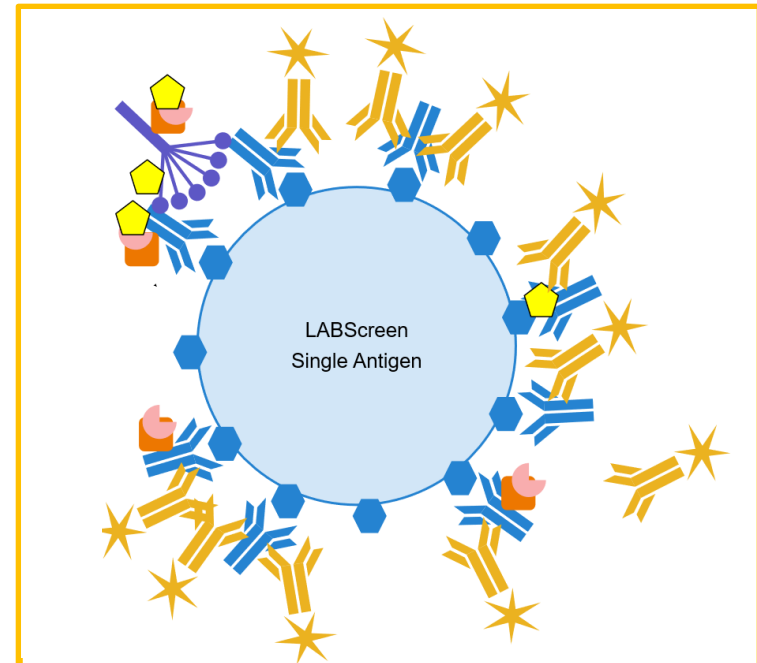
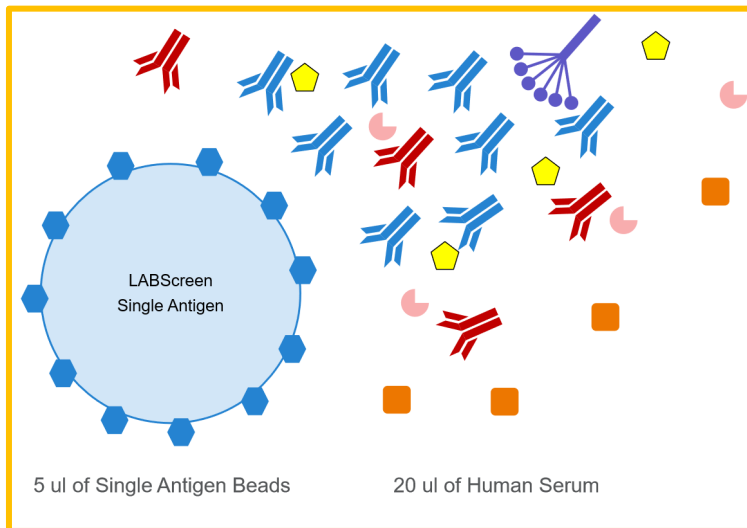
- 補体成分が抗HLA抗体に結合することで、二次抗体の結合が阻害され、偽陰性となることがある(この現象をプロゾン現象と呼ぶ)
- 補体活性経路に必要な Ca^{2+} をキレートすることで除去し、補体経路の活性化を抑える

試薬と血清の反応(通常の反応)

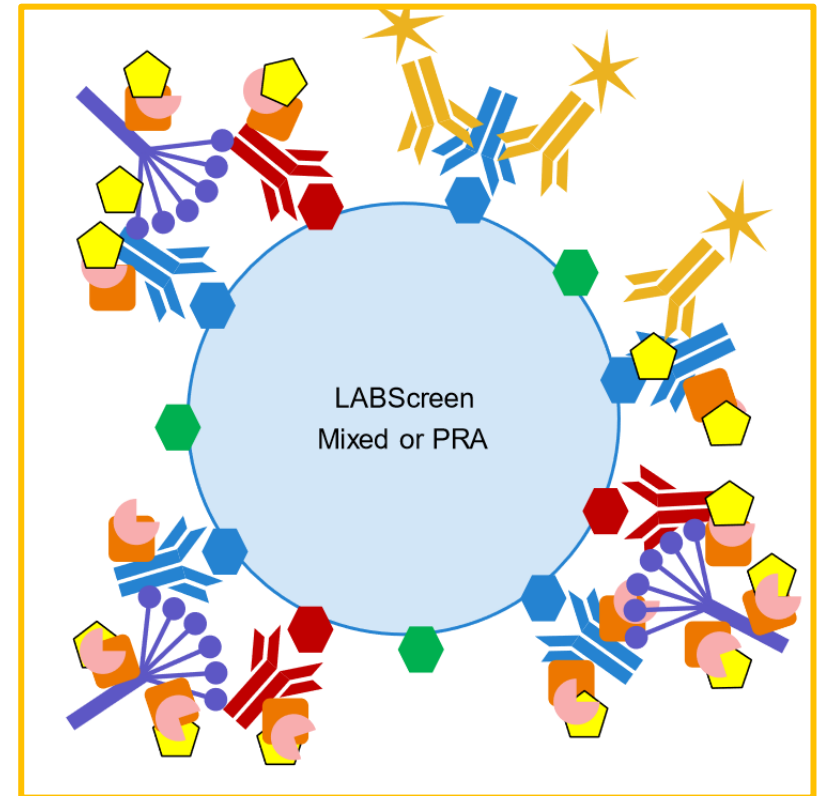
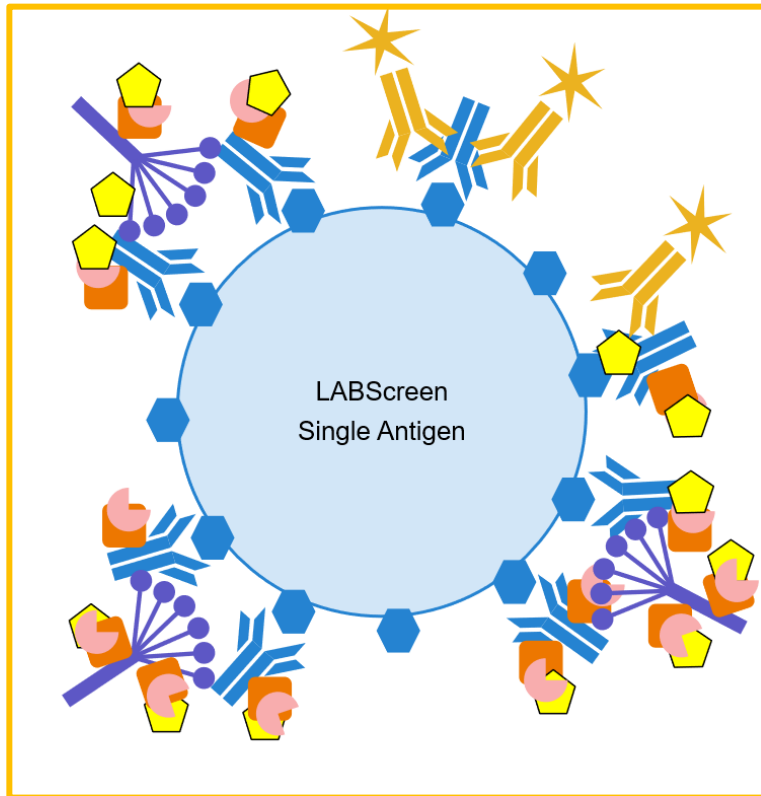
アイコンの説明

-  HLA抗原
-  抗HLA抗体
-  非特異抗HLA抗体
-  補体(C1q)
-  補体(C4)
-  補体(C2)
-  補体(C3)
-  二次抗体

補体活性が低い場合は、二次抗体が抗HLA抗体に結合できるので、nMFIの値に影響を与えない

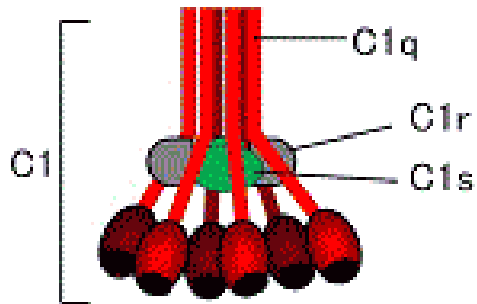


試薬と血清の反応(補体活性が高い場合)

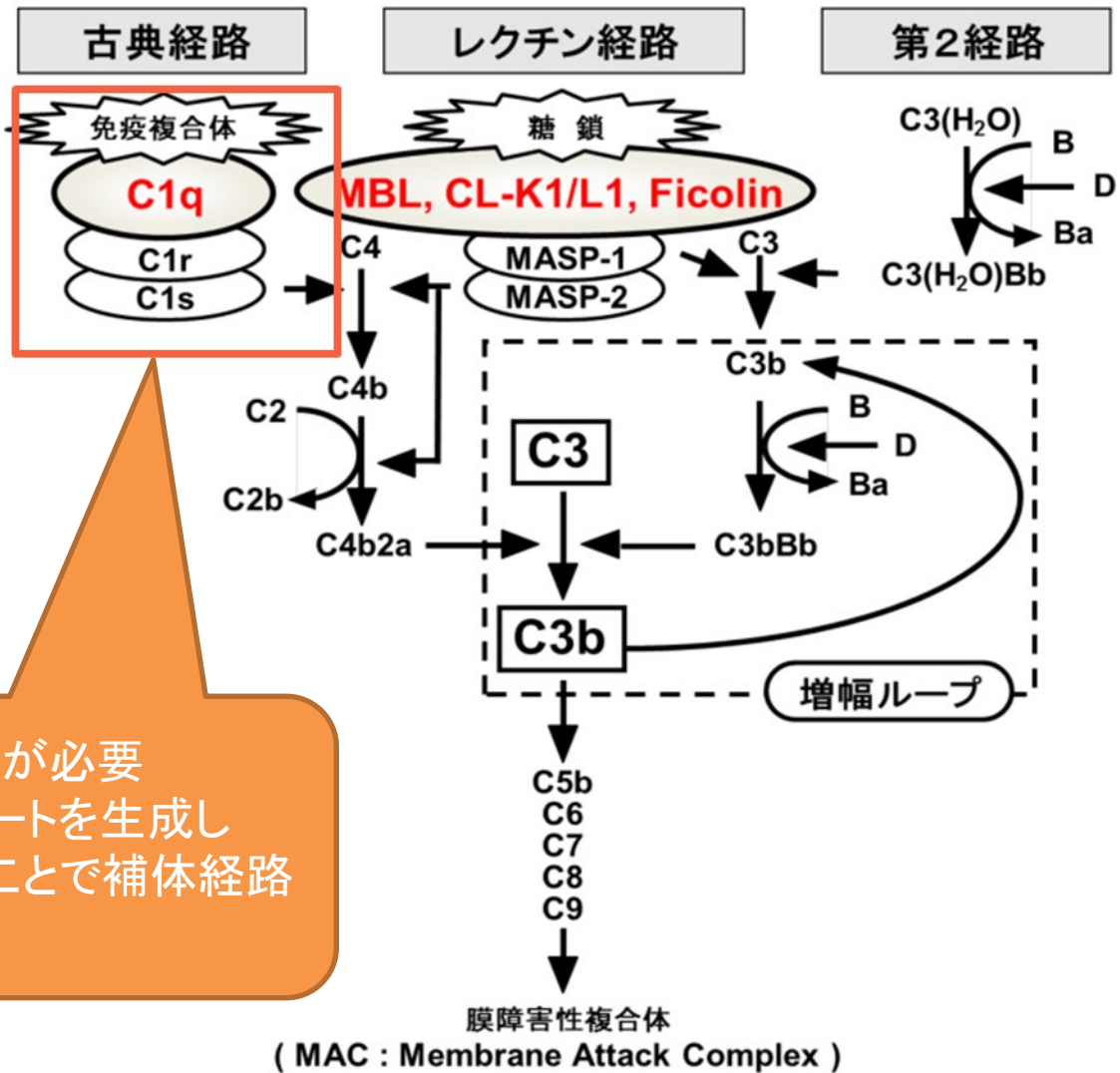


補体が抗HLA抗体に結合するため、二次抗体が結合できなくなる
→nMFIの値が下がる(偽陰性となる可能性がある)

補体活性経路



C1複合体の構造



C1の活性化にはCa²⁺が必要
 →EDTAはCa²⁺とキレートを生成し
 Ca²⁺の働きを抑えることで補体経路
 の活性化を阻害する

推奨プロトコール

- 血清90 μ Lに0.5M EDTA(メーカー不問)2 μ L添加
 - EDTAの濃度を約10mMとなるように調整する
 - 溶液状態のEDTAの利用を推奨
- 室温で30分間振とうしながら反応させる
- 20,000 gで10分間遠心、上清を使用

- 参考文献
 - HLA Antibody Specification Using Single-Antigen Beads—A Technical Solution for the Prozone Effect
(*Transplantation* 2011;92: 510–515)

EDTA処理のデータ例

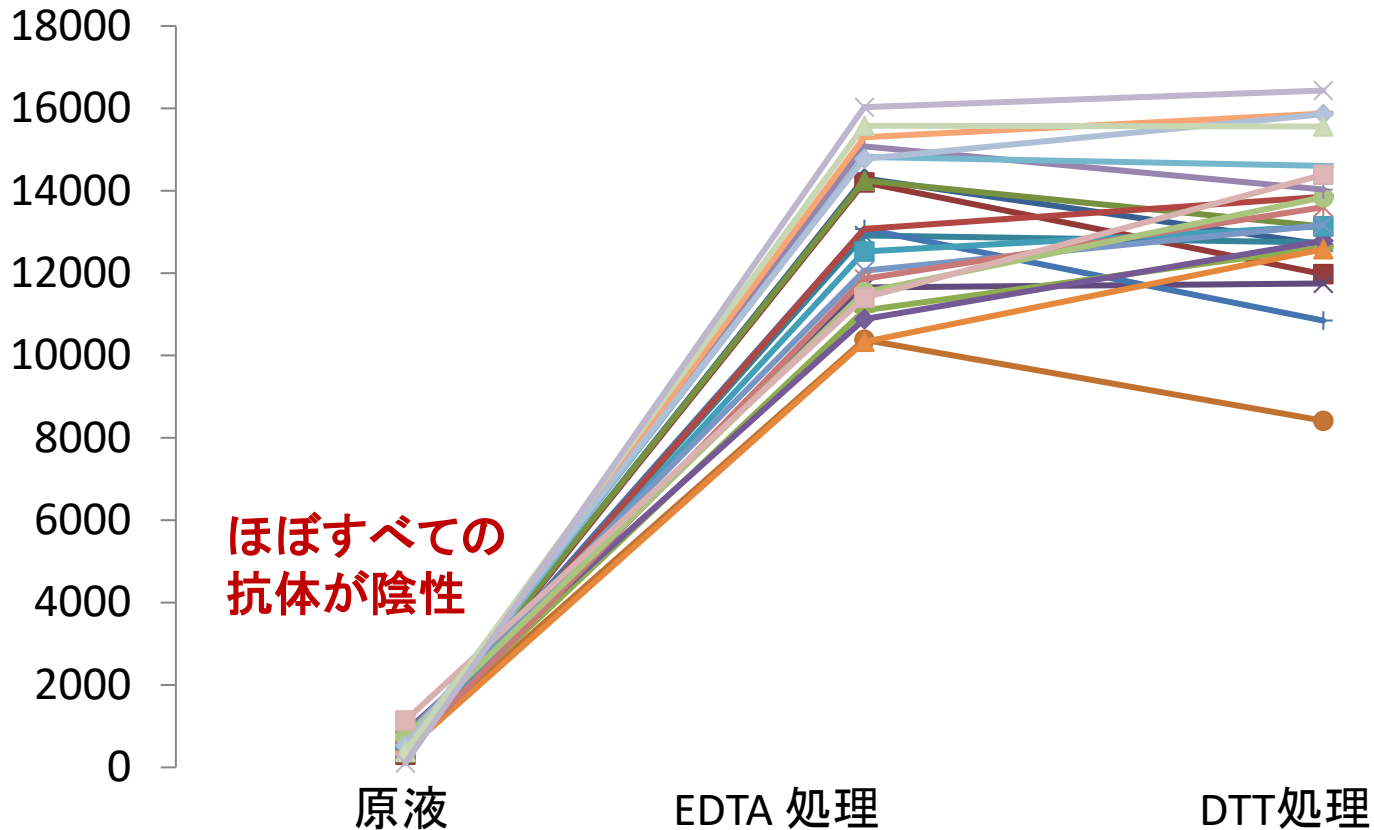
輸血歴：あり
移植歴：あり

術前検査

CDC : T cell , B cell 100%
FCXM T cell IgG : 10.5
FCXM B cell IgG : 33.1



DSAがあることが
予測される



プロゾーン現象

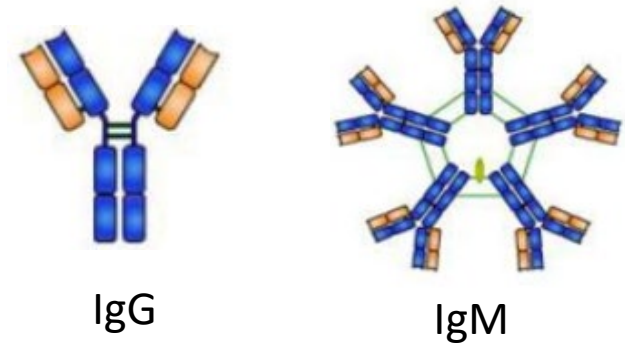
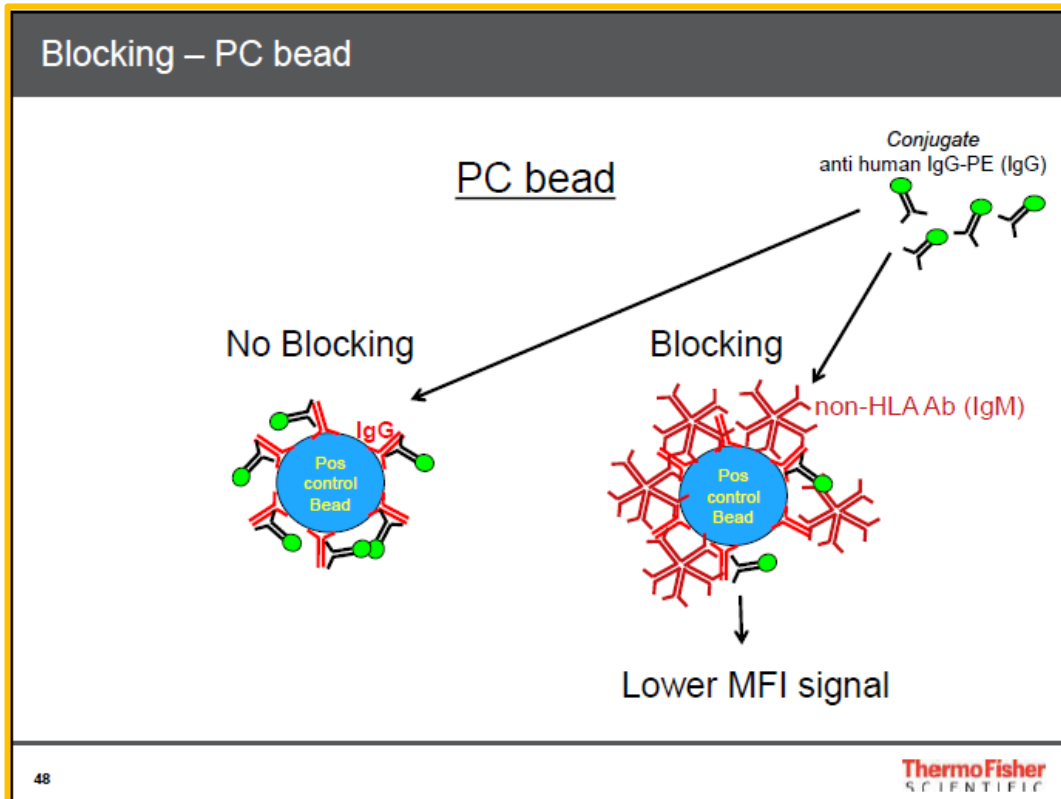
- 検体中に過剰な補体が存在することで、二次抗体の反応が阻害され、偽陰性となる現象
- 測定結果からプロゾーン現象が起こっているか否かは判断できない
- 前処理を行い測定結果に変化が見られればプロゾーン現象が起こっていたことがわかる
- 新鮮血清の場合、補体活性が高いことが多いため注意が必要

DTT処理【参考】

- 背景
 - IgM抗体が存在するとIgG抗体の結合を阻害することがある
 - IgMの5量体のジスルフィド結合を還元することで切断し不活化する
- 方法
 - 血清90 μL にDTT溶液(0.05M) 10 μL を添加(DTT終濃度:0.005M)
 - よく混合し、37°Cで30-45分インキュベート
 - 1,300G、10分間遠心

出典: ASHI LABORATORY MAMUAL Fourth Edition

IgMによるIgGの結合阻害



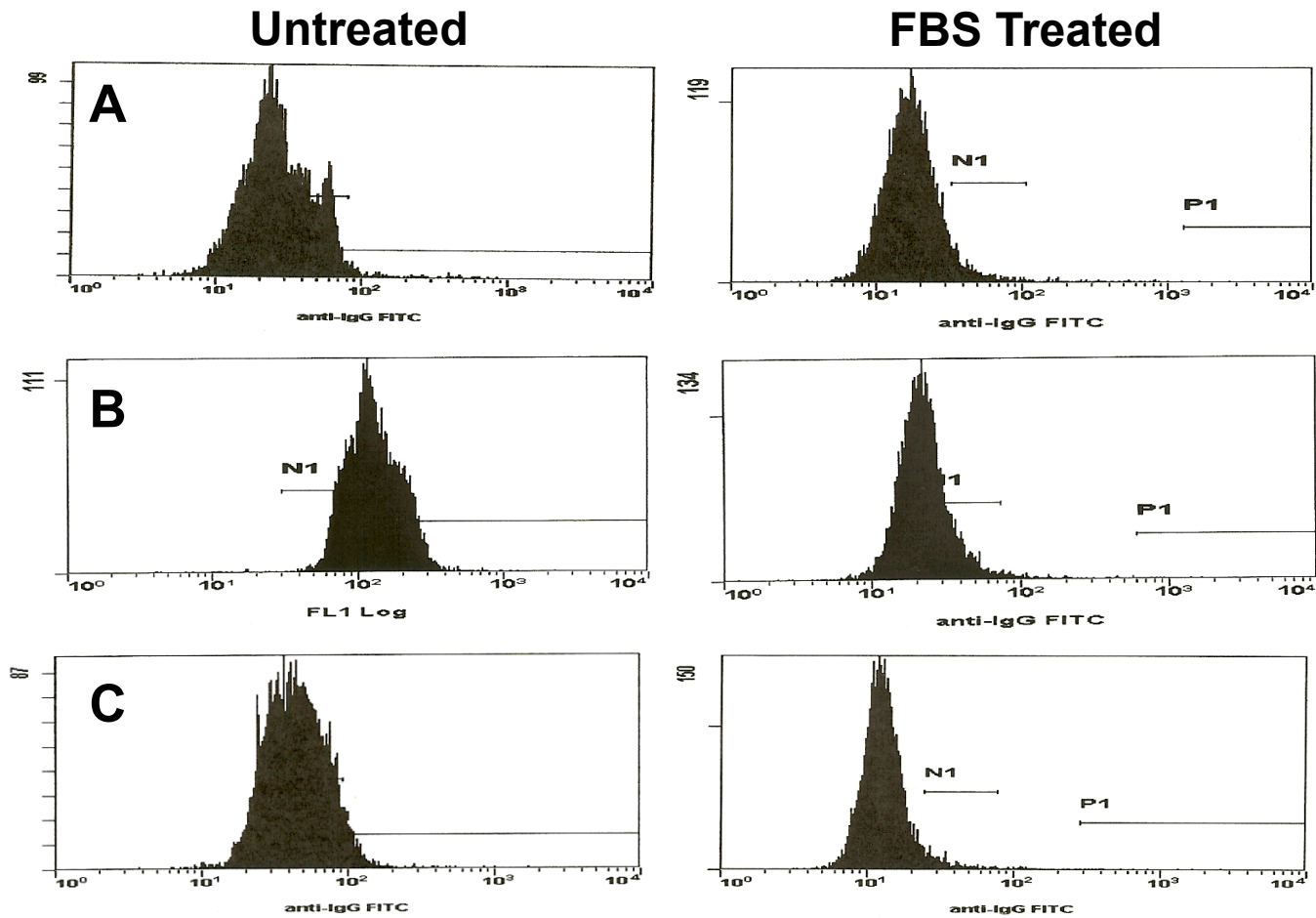
ビーズに5量体のIgM抗体が結合すると二次抗体(IgG)が結合できない
→偽陰性になる可能性がある

出典: One Lambda

FBS処理【参考】

- 目的
 - 非特異タンパクの除去
- 方法
 - 検体血清100 μ Lに対し、非動化したFBSを3 μ L添加
 - 37°C、20-30分間インキュベート
 - 10,000 gで20分間遠心
 - 中間層の血清を別のチューブに回収 FlowPRA、LABScreenに使用
- 参考資料
 - Charlene Breitenbach, Laesha Kaelin, Pamela Chapman, *et al.* Pretreatment of Patient Serum with Fetal Bovine Serum (FBS) Reduces Non-Specific Background and Enhances HLA Antibody Detection in Bead and Cell Based Assays. *Human Immunology*, Vol **74**, November 2013, page 57.

FBS処理のデータ例



出典:2011年ベリタスワークショップ

希釈【参考】

- 検体をPBS等で希釈することにより、非特異反応やプロゾーン現象を回避する
- 方法
 - PBSを用いて希釈
 - 希釈倍率の指定はないが、x2、x4、x8、x16から検討開始を推奨

超高速遠心【参考】

- 背景
 - 特にバックグラウンドの高い検体を超高速遠心することで、検体のイムノグロブリンを除去
- 方法
 - 100,000G、15-20分間遠心
 - 上清を回収
- 注意点
 - 超高速遠心機がない場合は、凍結融解を繰り返したり遠心時間を長くする等の方法を検討する

注意事項

- 前処理の方法によって前処理効果に違いがある
 - 再検査基準を満たすために前処理を行う
 - 前処理の原理を理解した上で、実施の基準や手順は各施設での設定をお願いします
- どのような前処理を行ってもバックグラウンドを取り除くことができない検体も存在する

ご清聴ありがとうございました。

ご質問はございますでしょうか。

