



# 今日から始めるHLA Vol.2 HLA抗体検査

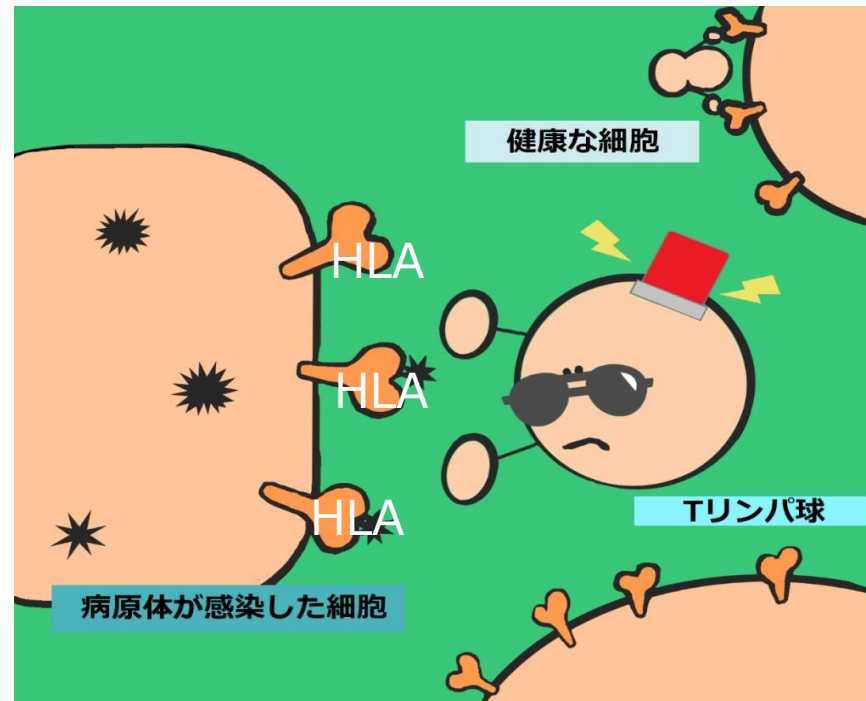
第1部 LABScreen試薬と手技

株式会社ベリタス

2023年10月11日

# HLA（ヒト白血球抗原：Human Leukocyte Antigen）とは

- ヒトにおける主要組織適合遺伝子複合体（MHC）として1952年頃に発見
- 自己と非自己を認識する免疫システムの一つ
- HLA分子上に抗原（ペプチド）を結合し、免疫細胞に提示



- 国際組織適合性ワークショップにて認定され、WHO命名委員会で命名
- 血清学的検査 + 細胞性免疫学的検査により細分化

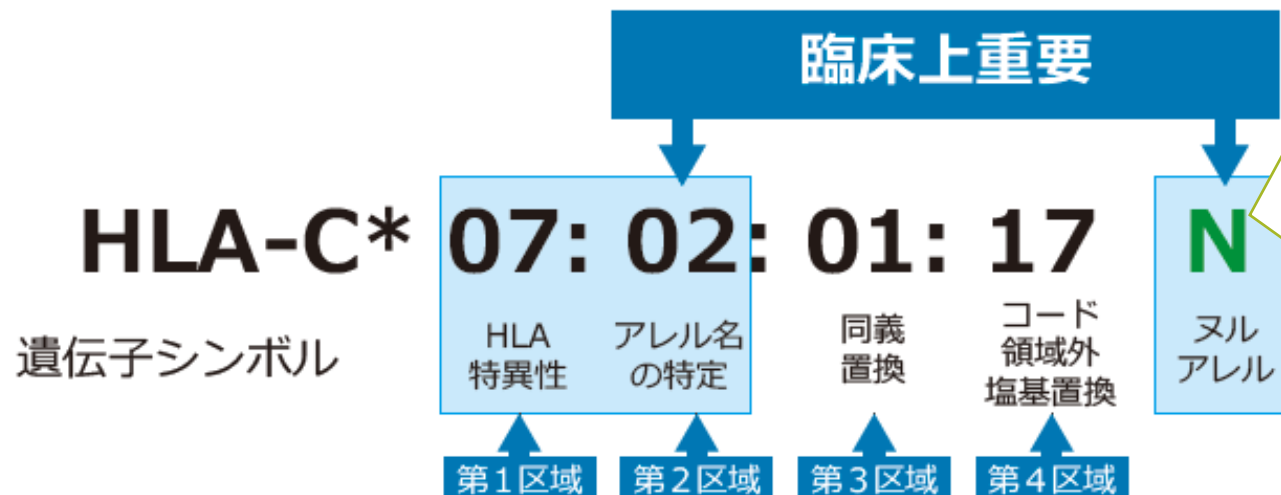
A	B	C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	B49(21)	Cw1	Dw1	DR1	DPw1
A2	B7	B50(21)	Cw2	Dw2	DR103	DPw2
A203	B703	B51(5)	Cw3	Dw3	DR2	DPw3
A210	B8	B5102	Cw4	Dw4	DR3	DPw4
A3	B12	B5103	Cw5	Dw5	DR4	DPw5
A9	B13	B52(5)	Cw6	Dw6	DR5	DPw6
A10	B14	B53	Cw7	Dw7	DR6	
A11	B15	B54(22)	Cw8	Dw8	DR7	
A19	B16	B55(22)	Cw9(w3)	Dw9	DR8	
A23(9)	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アレルの表記方法

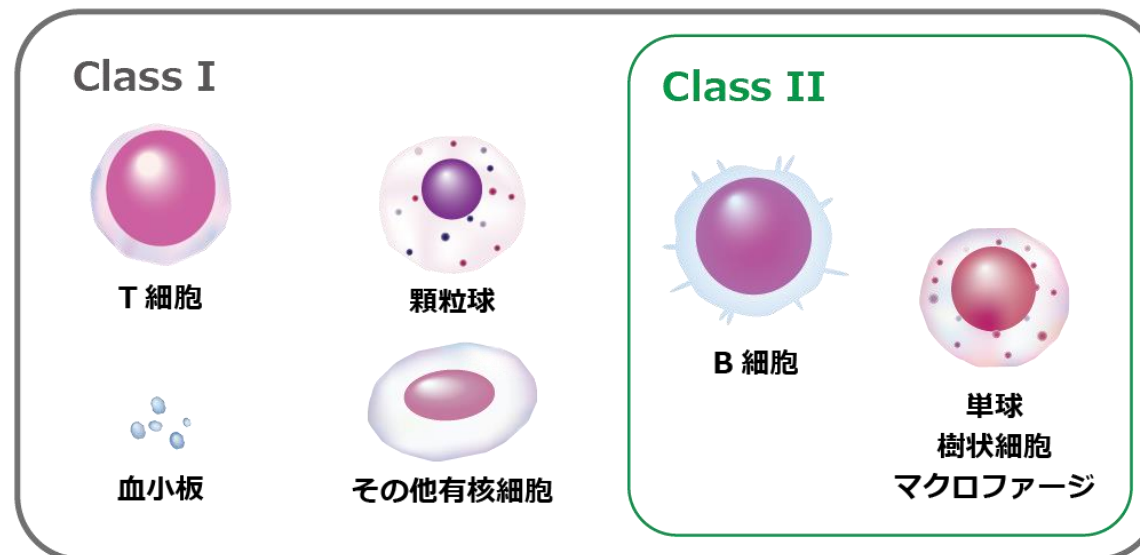


- N** : 発現していない
- L : 通常と比べ発現量が低い
- Q : 発現量が通常と異なる可能性 (明確なデータは無い)
- S : 可溶性分子として発現するが細胞表面上に無い
- C : 細胞質に存在するが細胞表面上に無い
- A : まったく発現していないかどうか疑わしい

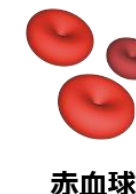
区域	桁数	表記例	解像度	上位区域との違い
第1区域	2桁	HLA-C*07	低	
第2区域	4桁	HLA-C*07:02		塩基置換 (アミノ酸配列に違い)
第3区域	6桁	HLA-C*07:02:01	高	塩基置換 (アミノ酸配列は同一)
第4区域	8桁	HLA-C*07:02:01:17N		分子をコードするエクソン外での塩基置換

# HLAのクラスと発現細胞

- Class I (A、B、C)
  - 多くの有核細胞に発現
  - 細胞内で合成されたタンパク質 (内因性ペプチド) を提示
    - 自己タンパク、感染細胞・腫瘍細胞由来タンパク
- Class II (DR、DP、DQ)
  - 抗原提示細胞に発現
  - 細胞外から入ってきたタンパク質 (外因性ペプチド) を提示
    - ウイルス、微生物など



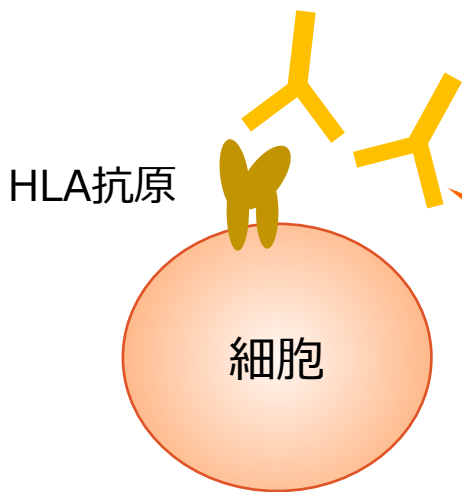
Class I、Class II ともに  
発現していない



赤血球

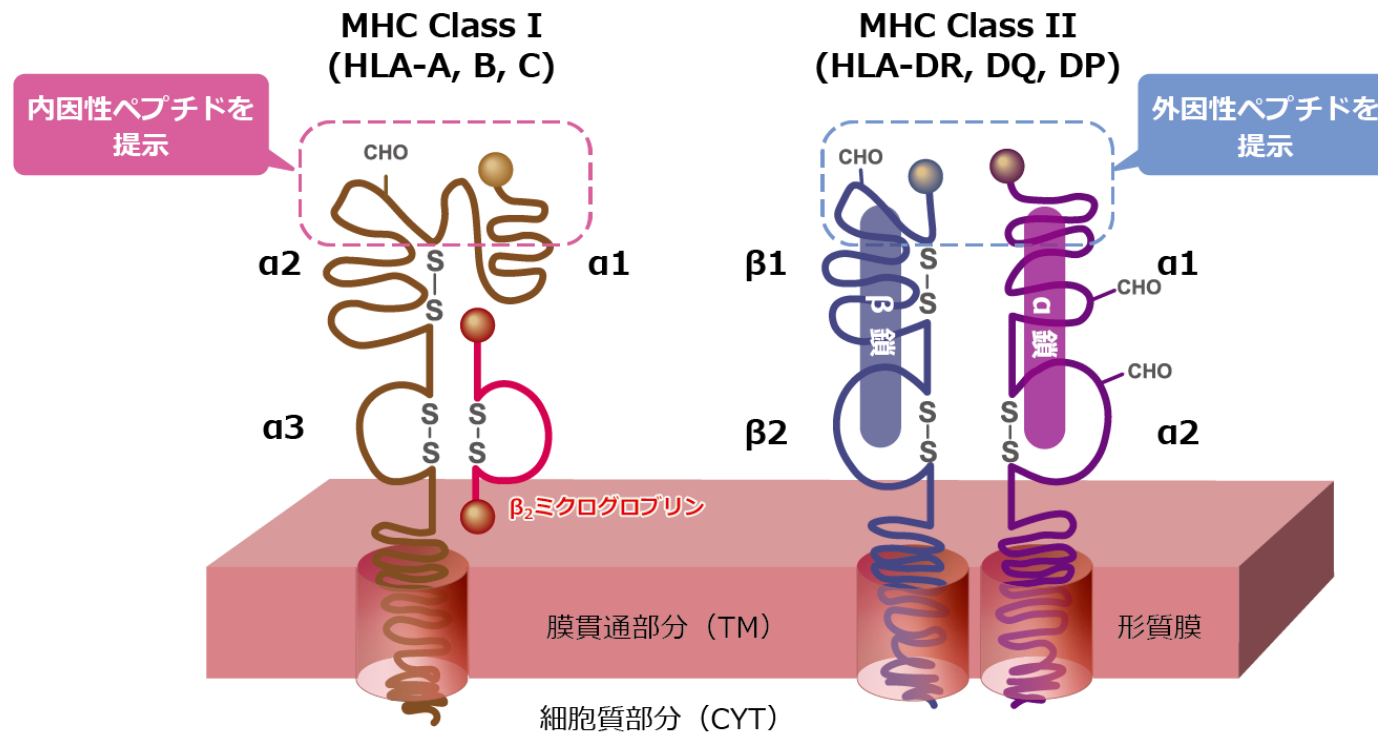
# 細胞表面におけるHLA分子の発現

- Class I (A, B, C)
  - $\alpha$ 鎖 +  $\beta$ 2ミクログロブリンで構成
  - $\alpha$ 1- $\alpha$ 2領域でペプチドを提示
- Class II (DR, DP, DQ)
  - $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖が会合
  - $\alpha$ 1、 $\beta$ 1領域でペプチドを提示



HLA抗原に対して  
産生された抗体

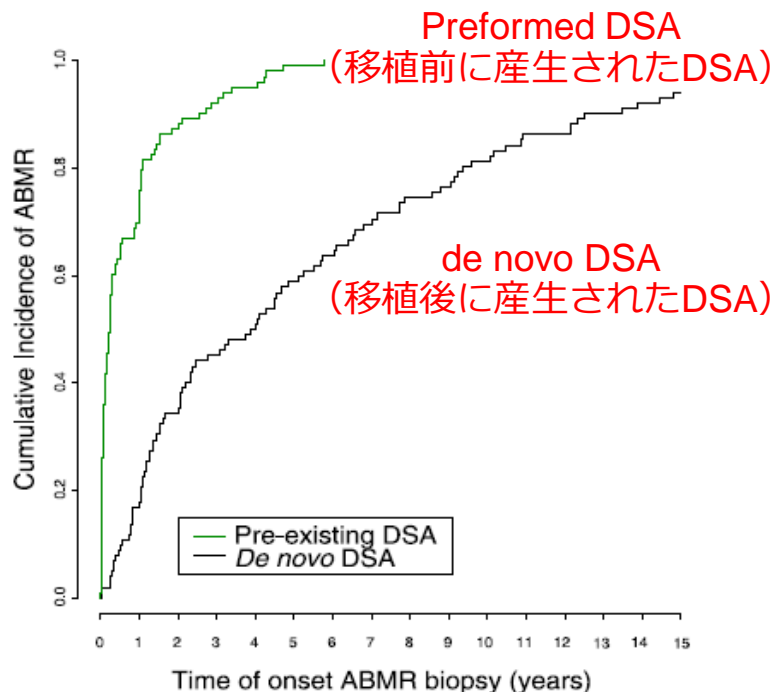
= 抗HLA抗体



- 臓器移植
  - 移植前にドナーHLAに特異的な抗体（Donor Specific Antibody : DSA）が存在すると超急性拒絶反応につながる
  - 移植後にDSAが産生されると慢性拒絶反応、生着率の低下につながる
- 造血幹細胞移植
  - DSAの存在が生着不全につながる
- 輸血
  - 輸血副作用の要因の一つ
    - 血小板不応状態（PTR）
    - 発熱性非溶血性副作用（FNHTR）
    - 輸血関連急性肺障害（TRALI）
- その他疾患
  - 新生児同種免疫性血小板減少症（NAITあるいはNAITP）

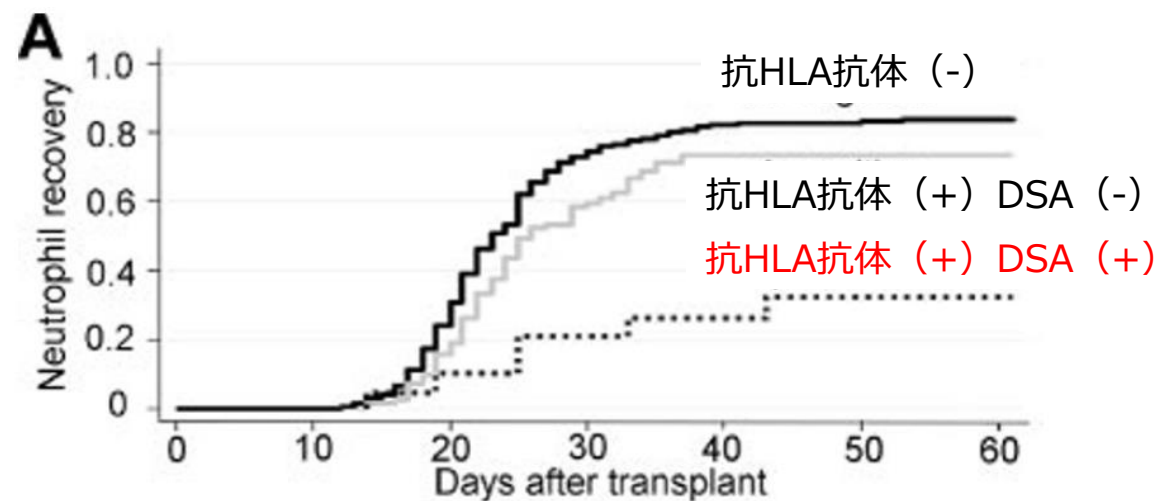
# 抗HLA抗体 (DSA) と移植成績

臓器移植  
(腎移植後からの抗体関連型拒絶の発生時期)



Aubert O, et al. J Am Soc Nephrol. 2017; 28: 1912-23.

造血幹細胞移植  
(さい帯血移植後の好中球回復速度)



Takanashi M, et al. Blood. 2010; 116: 2839-46.

抗体検査によって抗HLA抗体の有無や種類を測定することは  
患者様の予後に重要

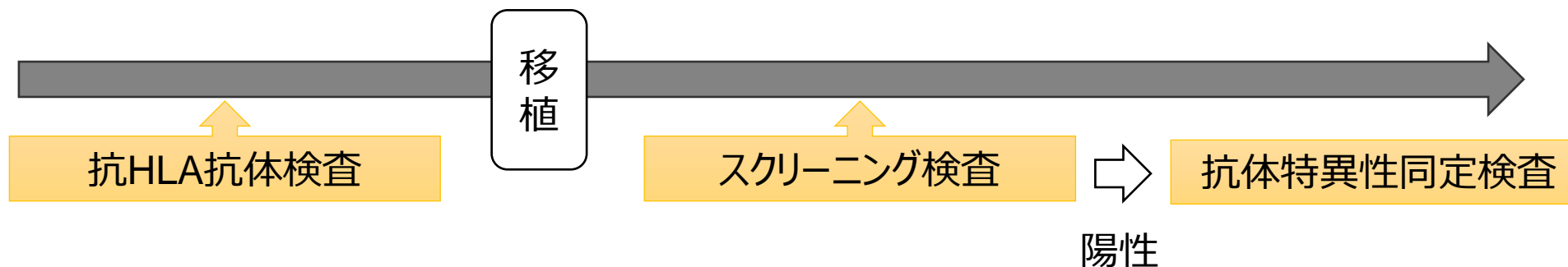


# 抗HLA抗体測定に関連する保険収載内容

## ・臓器移植

※ 2023年10月時点

実施時期	検査内容	点数
移植前	抗HLA抗体検査	4,000点
移植後	スクリーニング検査	1,000点
	抗体特異性同定検査 (スクリーニング検査で陽性が観察された症例の場合のみ)	4,850点



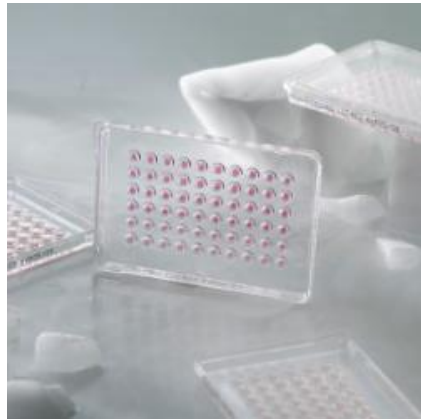
## ・造血幹細胞移植

– 移植前に抗HLA抗体検査を実施した場合に4,000点

全ての検査において、検査方法・試薬の指定はない

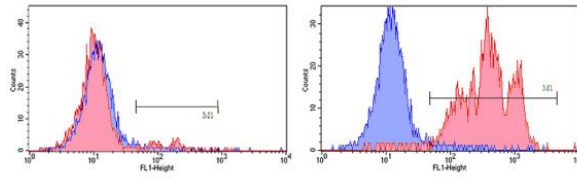
# 抗HLA抗体検査の歴史

- 大量検体を高感度かつ高精度で測定できる手法が開発
- 複数アッセイを組み合わせて評価



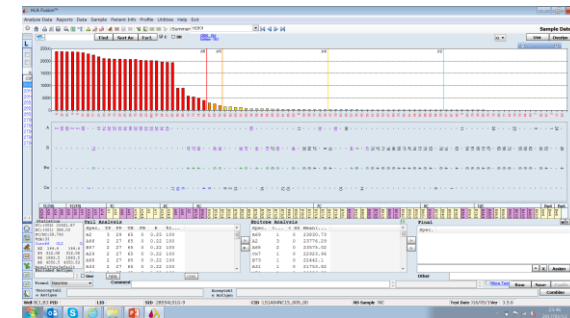
ELISA法  
(LAT)

細胞障害性試験  
(LCT/CDC)



フローサイトメーター  
(Flow PRA)

Luminexビーズ  
(LABScreen)

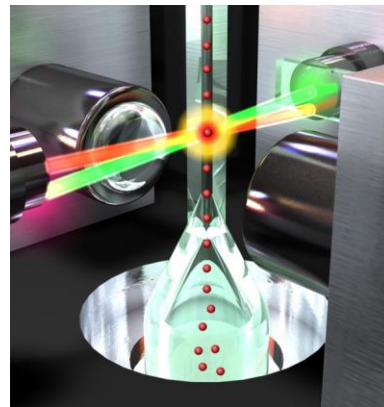
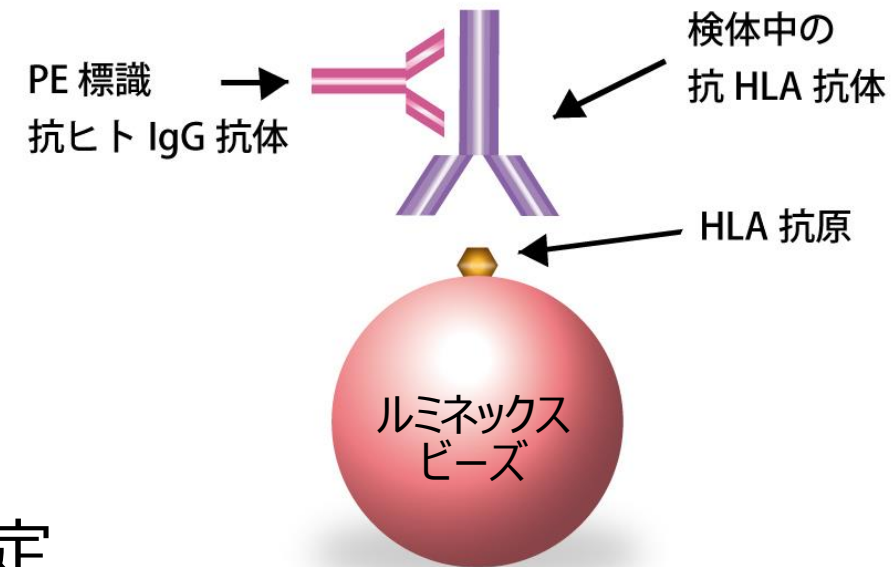


# LABScreen試薬の 原理と種類

# LABScreen試薬の原理

## ルミネックスビーズを使用したマルチフローサイトメトリー

- HLA抗原を結合したビーズを複数種使用
  - 各ビーズは番号が割り当てられる
  - 異なる色で着色
- HLA抗原と結合した抗HLA抗体に  
蛍光標識した抗ヒトIgG抗体（二次抗体）を反応
- 蛍光ビーズの種類と蛍光強度をLuminex機器で測定



- 赤、緑の2色のレーザーを搭載
  - 赤色：ビーズの番号を識別、数をカウント
  - 緑色：PE蛍光強度の測定

# LABScreen試薬の種類

- **スクリーニング試薬**：抗原の**有無**を測定

- LABScreen Mixed
- LABScreen PRA

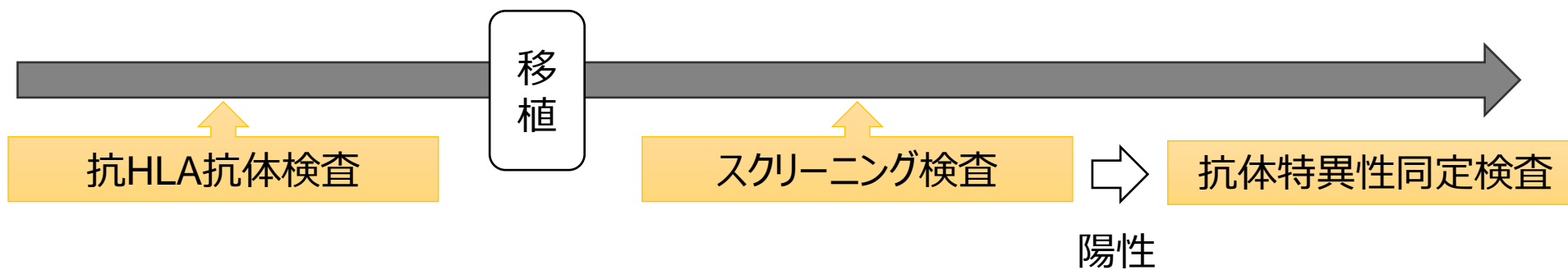
抗HLA抗体検査、  
スクリーニング検査に使用



- **特異性同定試薬**：抗原の**種類**を同定

- LABScreen Single Antigen
- 追加ビーズ
  - LABScreen Single Antigen Supplement
  - LABScreen Single Antigen ExPlex

抗HLA抗体検査、  
抗体特異性同定検査に使用



# Mixed、PRA、Single Antigenの違い

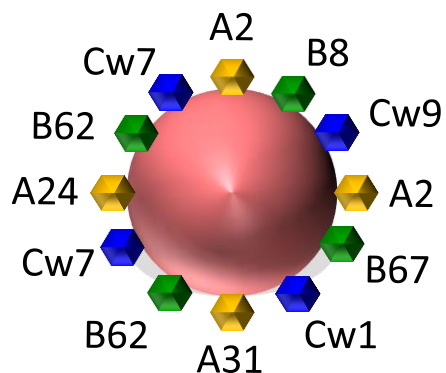
- ビーズに結合している抗原の種類とビーズの種数が異なる

スクリーニング試薬

複数の細胞（パネル）の抽出抗原が結合

## Mixed

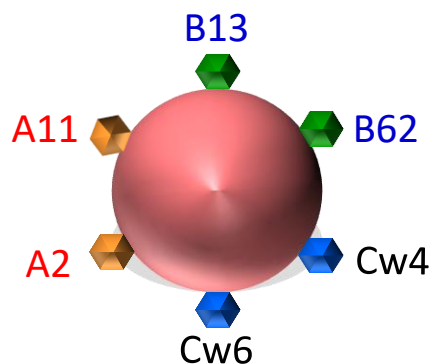
Class I: 3パネル/ビーズ  
Class II: 5パネル/ビーズ



ビーズの種類：17種

## PRA

1パネル/ビーズ



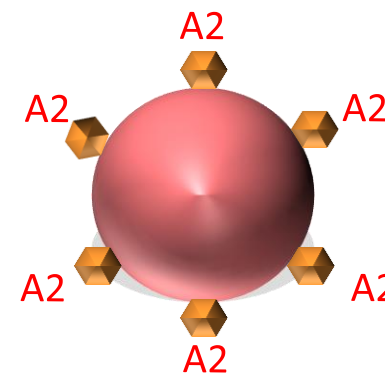
ビーズの種類：56種 (Class I)  
35種 (Class II)

特異性同定試薬

1種類の精製抗原が結合

## Single Antigen

1抗原/ビーズ



ビーズの種類：95種 (Class I)  
97種 (Class II)

\*1パネル = 1細胞分 (1人分) のハプロタイプ

# 試薬に含まれる抗原情報

- ロットごとのWorksheetに記載

Mixed  
(Lot024)

Beads ID	Ag. ID	Cell ID	Panel Typing								*Normalized Background Value
			A		B		Bw		C		
1	NC	NC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	PC	PC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	19569
6	Class I-1	G0229	A1	A80	B18	B50	BW6	NA	CW2	CW6	60
		E5732	A1	A29	B8	B45	BW6	NA	CW6	CW7	
		E41074	A1	A69	B8	B55	BW6	NA	CW1	CW7	
	Class I-2		A11	A24	B62				CW9	CW4	50
			A2	A24	B54				CW1	CW7	
			A2	A31	B62				CW7	NA	
3		E12627	A2	A24	B60	B46	BW6	NA	CW1	CW10	

3パネルビーズ  
(Class I)

ビーズ番号

細胞ID

抗原情報

1パネルビーズ

PRA  
(Class I Lot020)

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	N/A	C*01:02	N/A
		A*01:01		B*49:01	B*55:01	C*03:03	C*07:01

ビーズ番号

細胞ID

抗原情報

Single Antigen  
(Class I Lot014)

Bead ID	Antigen ID	Molecular Typing	Serological Typing	*W6/32	Results
1	NC	NA	N/A	56	
2	PC	NA	N/A	120	
3	rA0101	A*01:01	A1	24360	
			A2	23678	

ビーズ番号

抗原ID

抗原情報

1抗原ビーズ

# NCビーズとPCビーズについて

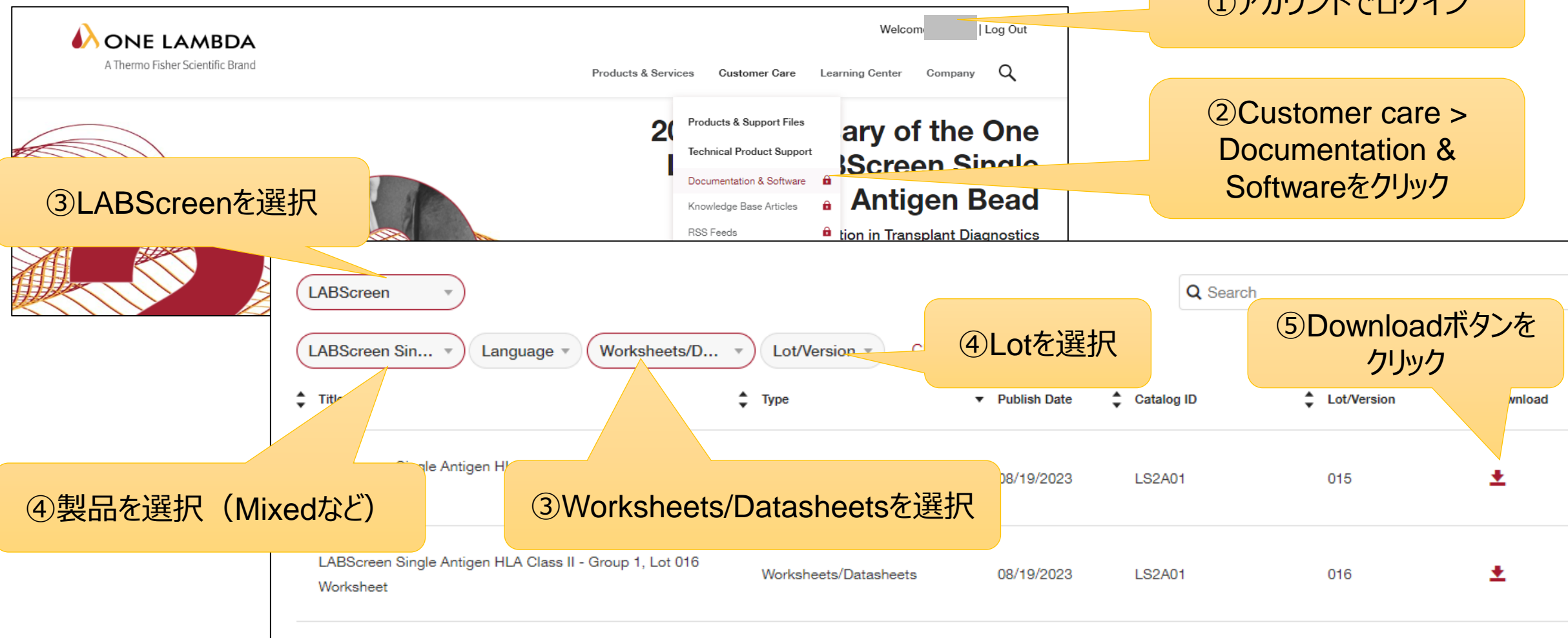
- 全ての試薬に共通して1番ビーズにNC、2番ビーズにPCを含む
- NCビーズ
  - HLA抗原が何も結合していないビーズ
  - 検査におけるバックグラウンドの補正
  - 検体内に抗HLA抗体以外のタンパク質が含まれない場合は理論上ゼロとなる
- PCビーズ
  - 精製されたヒトIgGが結合しているビーズ
    - 二次抗体が必ず結合する
  - 検査が正常に行われたこと（蛍光値が正しく検出されていること）の確認

Beads ID	Ag. ID	Cell ID	Panel Typing								*Normalized Background Value	
			A		B		Bw		C			
1	NC	NC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	PC	PC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	19569
		G0229	A1	A80	B18	B50	BW6	NA	CW2	CW6		



# 参考：ワークシートの入手方法

- One Lambda HPよりダウンロード可能



①アカウントでログイン

②Customer care > Documentation & Softwareをクリック

③LABScreenを選択

④Lotを選択


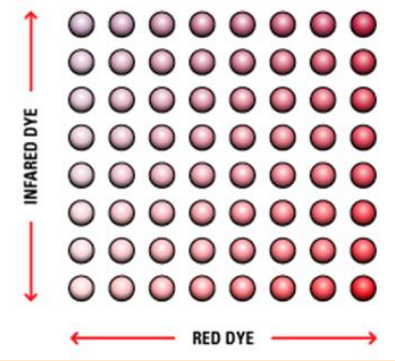


⑤Downloadボタンをクリック

④製品を選択 (Mixedなど)

③Worksheets/Datasheetsを選択

Title	Type	Publish Date	Catalog ID	Lot/Version	Download
LABScreen Single Antigen HLA Class II - Group 1, Lot 015		08/19/2023	LS2A01	015	↓
LABScreen Single Antigen HLA Class II - Group 1, Lot 016 Worksheet	Worksheets/Datasheets	08/19/2023	LS2A01	016	↓

# LABScreenの測定装置 (LABScan/医療機器)

名称		ビーズ数	対応するLABScreen試薬
LABScan システム	 <p>(届出番号：13B3X10148000010)</p>	<p>100色 (10×10)</p> 	<p>Mixed PRA Single Antigen Single Antigen Supplement (ExPlexは不可)</p>
LABScan 3Dシステム	 <p>(届出番号：13B3X10148000020)</p>	<p>500色 (10×10×5)</p> 	<p>全て使用可能</p>

# LABScreen試薬による 測定の方法

# 使用する試薬

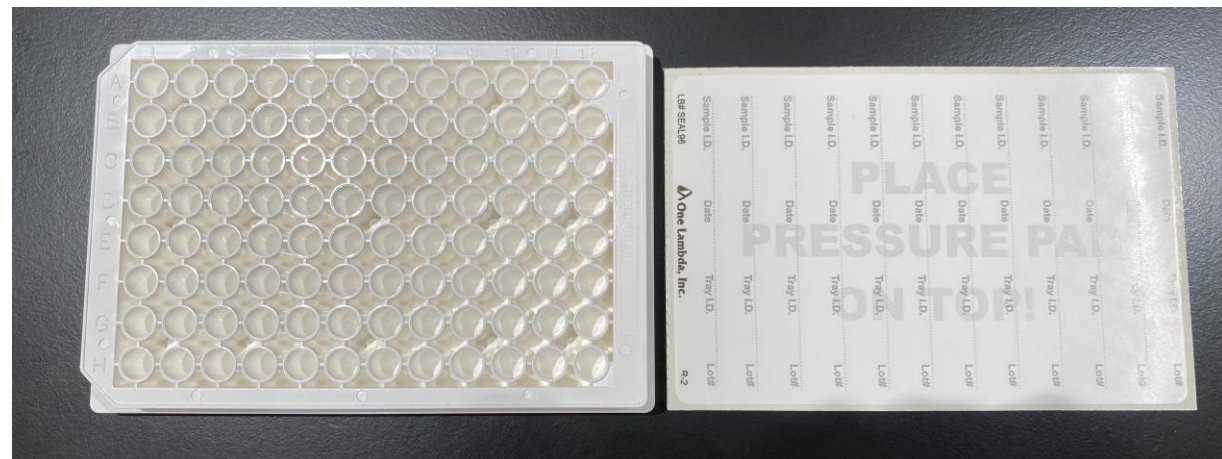
- LABScreen試薬キット（各種）
  - Wash Buffer (x10)
    - 冷蔵保存
  - ビーズ
    - 開封後は冷蔵・遮光保存。再凍結厳禁
    - 解凍後3か月以内に使用
- LABScreen ネガティブコントロール血清
  - 初回解凍時に小分け分注、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で保存
- PE Conjugated Goat Anti Human IgG
  - 開封前は冷蔵保存
  - 滅菌水で希釈、原液とする
    - 添加量はロットによる
    - 冷蔵・遮光保存（6か月以内に使用）
- 各種前処理試薬（Adsorb Out、EDTAなど）
- 1 x PBS



使用する試薬のロットと  
使用期限を確認してください

# 使用する機器・消耗品

- 96 wellマイクロプレート（V底を推奨）
  - 参考商品：UNIPLATE (white)（7701-3250：Whatman）
- プレートシール
  - 参考商品：SSP Tray Seals（SSPSEA300：One Lambda）
- プレートシェーカー
- プレート遠心機（1,300Gもしくは1,500G可能なもの）
- チューブ遠心機
- ボルテックス



検体の前処理

抗HLA抗体とビーズの結合

洗浄（3回）

二次抗体の結合、洗浄（2回）

LABScan測定

# 検体の前処理

検体には試薬の反応を阻害する物質が含まれることがある  
→検査に適した状態にする必要

- 血清を推奨。血漿の場合はACDまたはK-EDTA添加
- 必須の操作は「凍結融解 + 遠心」
  - 凍結 (-20℃もしくは-70℃以下)
  - 室温で解凍、転倒混和
  - 遠心 (8,000~10,000G、室温、10分間以上)
- 遠心後、中間層より検体を採取する

不純物が多い検体は、遠心速度、時間を増やす

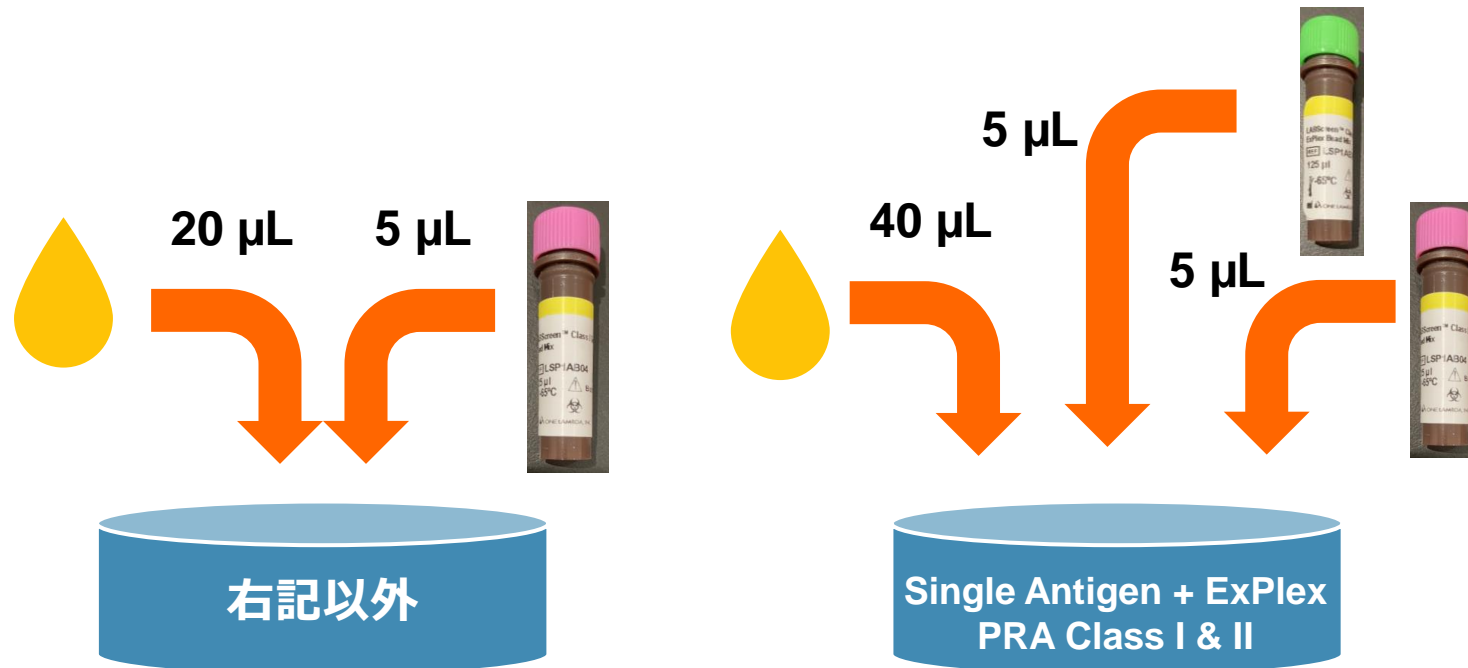
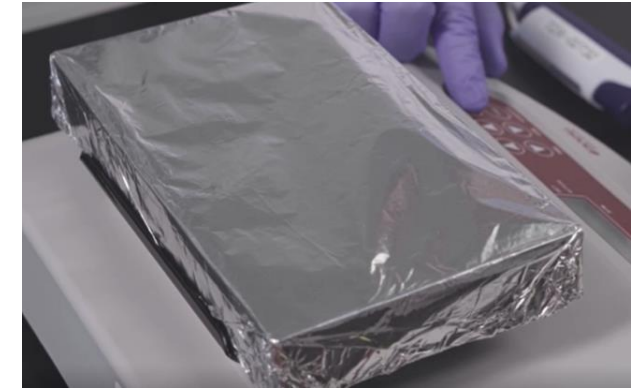
- 必要に応じて他の前処理を追加する

詳細は第2部で説明いたします



# 抗体とビーズの結合

- 検体20  $\mu$ Lとビーズ5  $\mu$ Lを混合
  - 1ウェルで複数試薬を使用する場合は検体40  $\mu$ L、ビーズ各5  $\mu$ L
- プレートにシール
- **遮光**、室温（20-25 $^{\circ}$ C）で振とうしながら30分間反応



- 使用前にビーズをボルテックスで十分混合する
- 反応時間は正確に
- 反応時は遮光する
- 黒マジックのみ使用可



# 洗浄（3回）

- 洗浄バッファーを150  $\mu$ L加える
- 遠心（1,300G 5分または1,500G 3分）
- フリッキング→タッピング→ドライボルテックス
- 3回繰り返す
  - 2回目以降の洗浄バッファーは200  $\mu$ L

- 洗浄バッファーは作り置きしない
  - 必要量：1ウェルあたり約1.1mL
- フリッキングは真下に一回のみ
- タッピングはトレーを下向きにして数回キムタオルに押し付ける



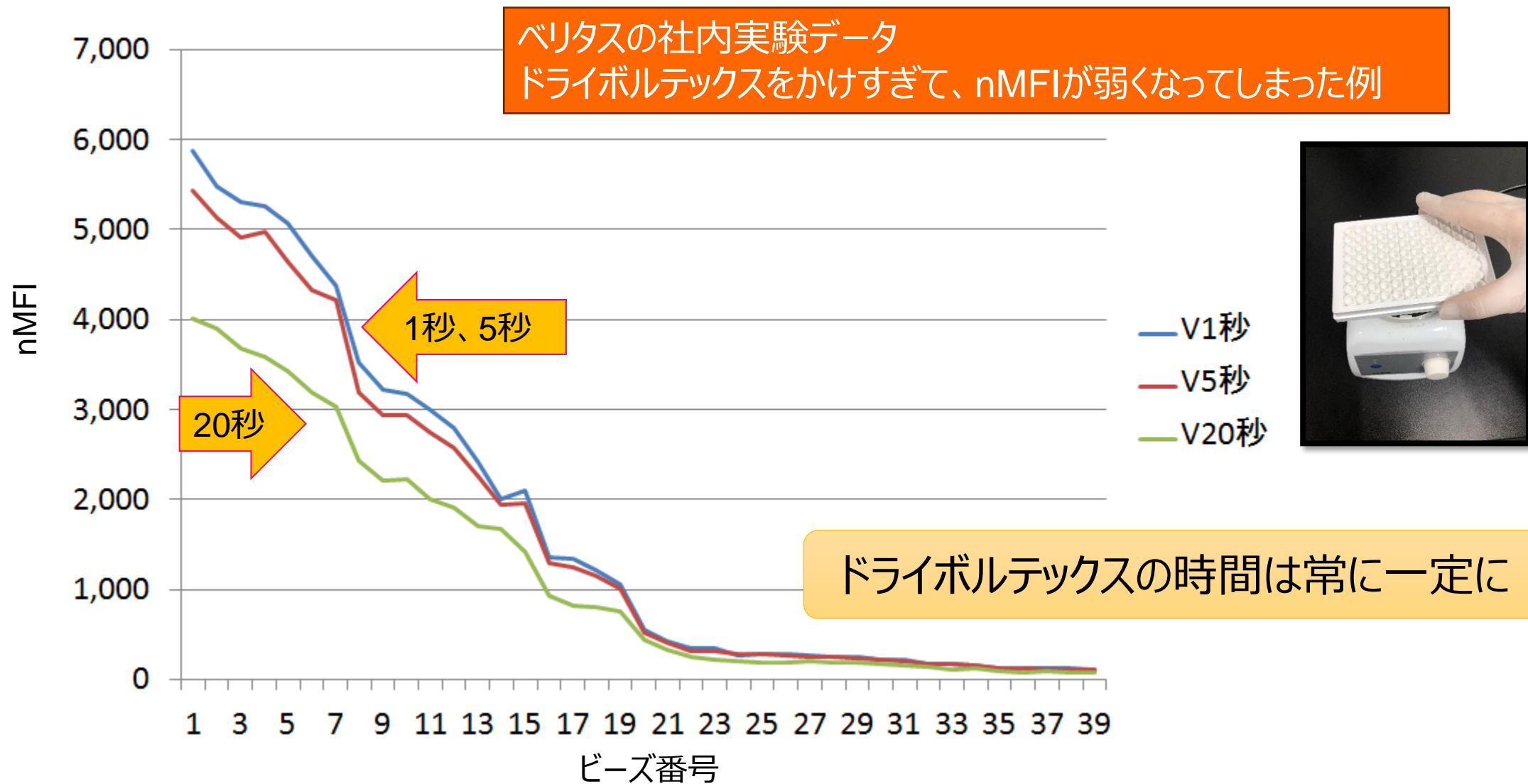
動画も参照ください



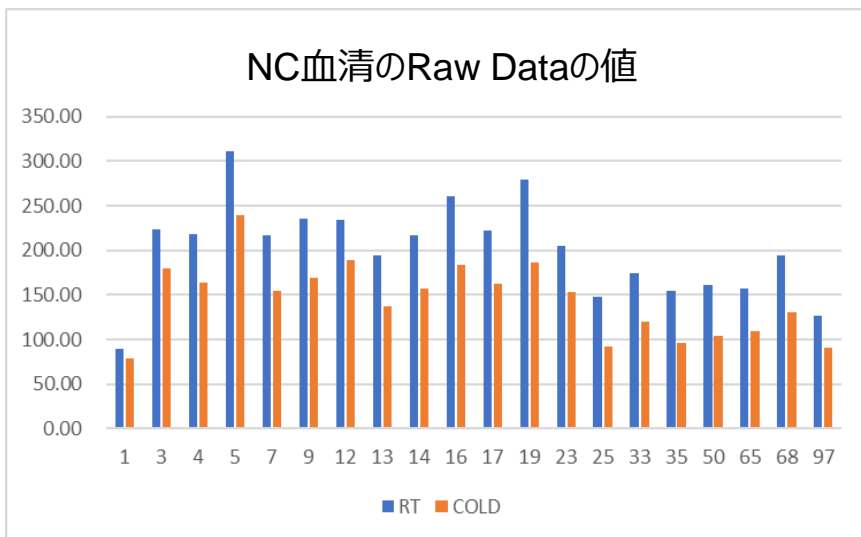
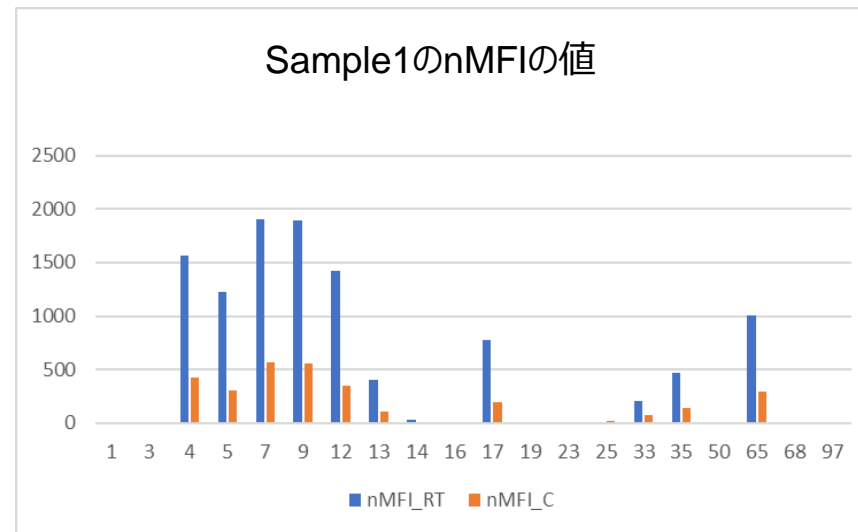
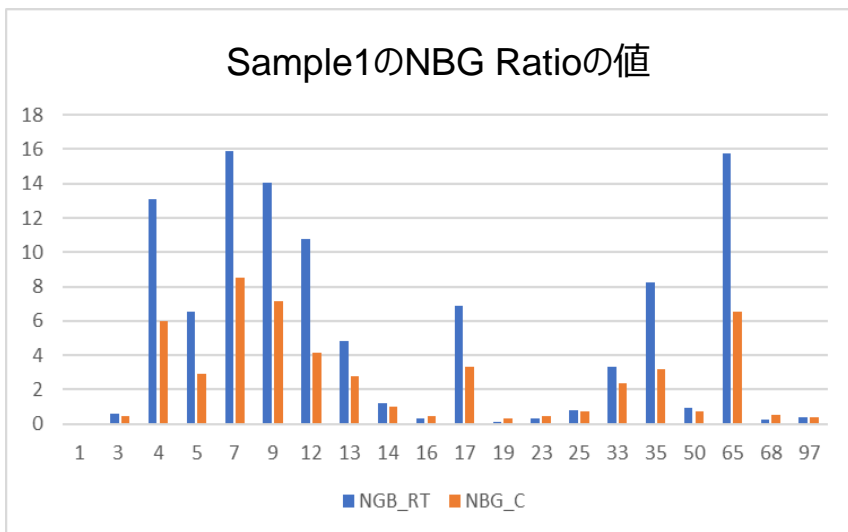
ベリタス HLA 動画



# 参考：ドライボルテックス時間の影響



# 参考：Wash Bufferの温度の影響（LABScreen Mixedの例）



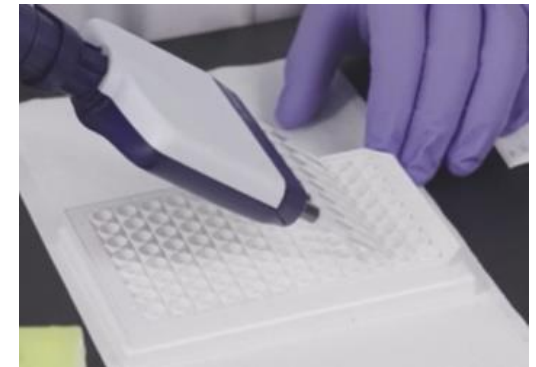
冷蔵(C)と室温(RT)ではnMFI、NBG Ratio共に室温の方が高い  
→Wash Bufferの温度が測定結果に影響を与える

常に同じ条件のWash Bufferを使用

# 二次抗体反応、洗浄

- 二次抗体を100倍希釈し各ウェルに100 uL添加、プレートにシール
- 遮光し室温（20-25°C）で振とうしながら30分間反応
- 洗浄バッファーを加えずに遠心（1,300G 5分または1,500G 3分）
- フリッキング→タッピング→ドライボルテックス
- 洗浄操作を2回繰り返す
  - 洗浄バッファーを200 μL加えて遠心
  - フリッキング→タッピング→ドライボルテックス
- 1 x PBSを各ウェルに80 uLずつ添加

- 二次抗体の希釈液は作り置きしない
- 二次抗体を希釈した後は使用まで遮光
- 反応時は遮光
- 洗浄、フリッキングなどの注意点は前ステップと同様です



# LABScanによる測定①

## • xPONENTでのバッチ作成

- 試薬の種類、ロットに対応したテンプレートファイルを選択
- 1ウェルで複数試薬を使用する際は各製品のロットを確認
- おもな製品のテンプレートファイルは弊社ウェブページよりダウンロード可能
  - [https://www.veritastk.co.jp/hla/soft\\_file.html](https://www.veritastk.co.jp/hla/soft_file.html)



LABScreen試薬例	テンプレートファイル名
Mixed (Lot024)	LSM12024_LS200_42[1].lxt LSM12024_LS3D_42[1].lxt
Single Antigen Class I(Lot014)	LS1A04014_LS200_42[1].lxt LS1A04014_LS3D_42[1].lxt
PRA Class I (Lot020) & Class II (Lot019)	LS1PRA020_LS2PRA019_LS200_42[1].lxt LS1PRA020_LS2PRA019_LS3D_42[1].lxt
Single Antigen Class I(Lot014) & ExPlex (Lot006)	LS1A04014_LS1AEX01006_LS3D_42[1].lxt

製品コード、製品ロット\_LABScan機器\_42[バージョン]

製品1コード、製品1ロット\_製品2コード、製品2ロット\_  
LABScan機器\_42[バージョン]

# LABScanによる測定②

- 測定ウェルの位置と検体情報を入力
- 測定開始

- 装置のメンテナンスを実施してください
  - 測定前のCalibration/Verification
  - 定期メンテナンス（Weekly、Monthly、プローブ洗浄）



何らかの理由ですぐに測定が出来ない場合

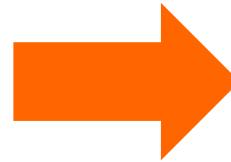
- プレートにシールをして冷蔵、遮光保存
- 検体調製後24時間以内は測定可能
- 測定前にピペティングで懸濁



# LABScreenの再検査基準

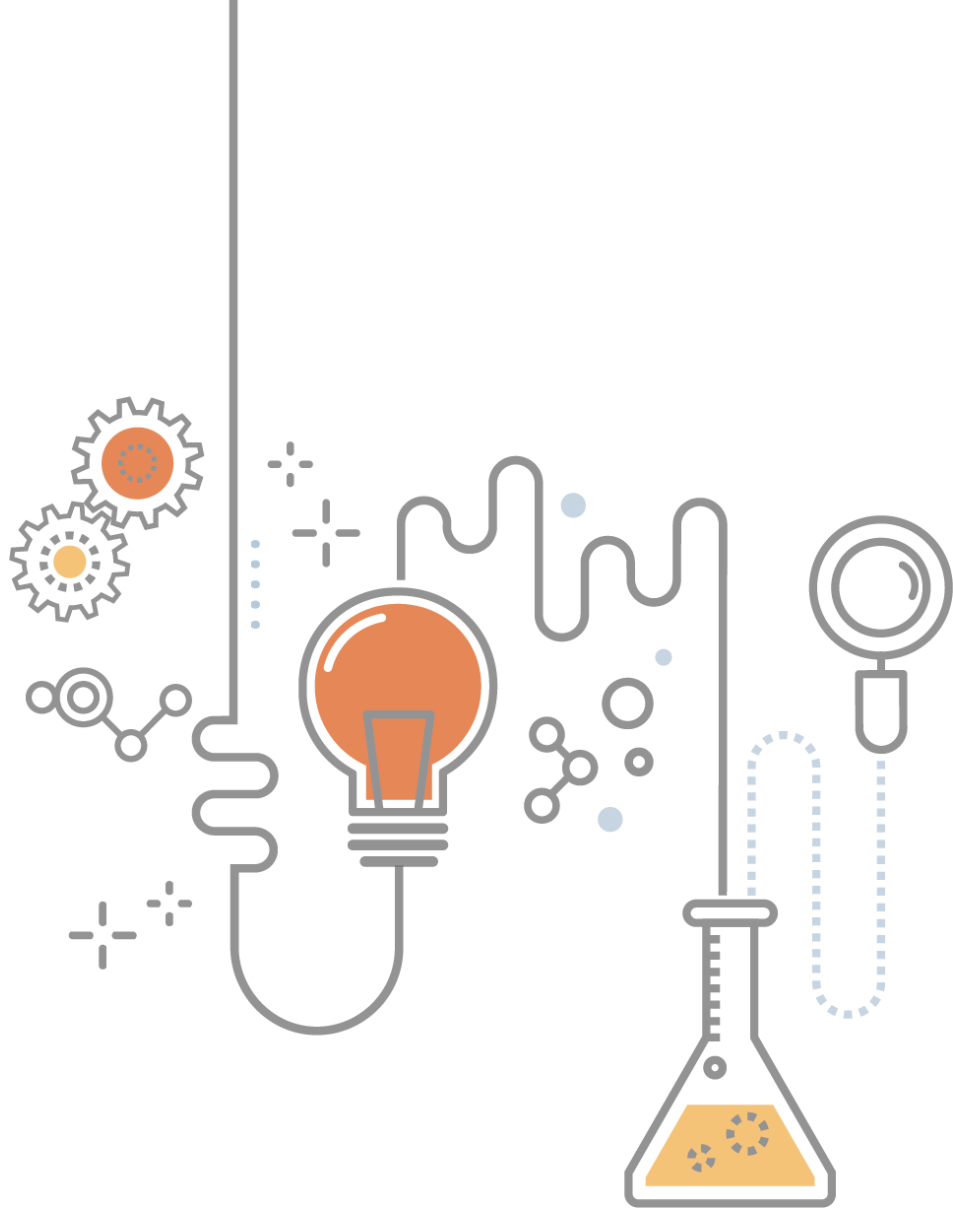
HLA Fusionで確認可能

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



詳細は第2部で説明いたします

Position	Sample	▽ Patient	Min BeadCnt	NC	PC	PCNCRatio	Ne Ar
9(1,A2)			100	67.58	10904.92	161.363	
10(1,B2)			100	82.33	9236.4	112.188	
11(1,C2)			100	33.34	9772.6	293.119	
12(1,D2)			100	55.7	10870.09	195.154	
13(1,E2)			90	60.29	11467.05	190.198	



ご清聴ありがとうございました。