



すぐに役立つHLA Vol.2 HLA抗体検査入門

LABScreen試薬と手技

株式会社ベリタス

2022年9月30日

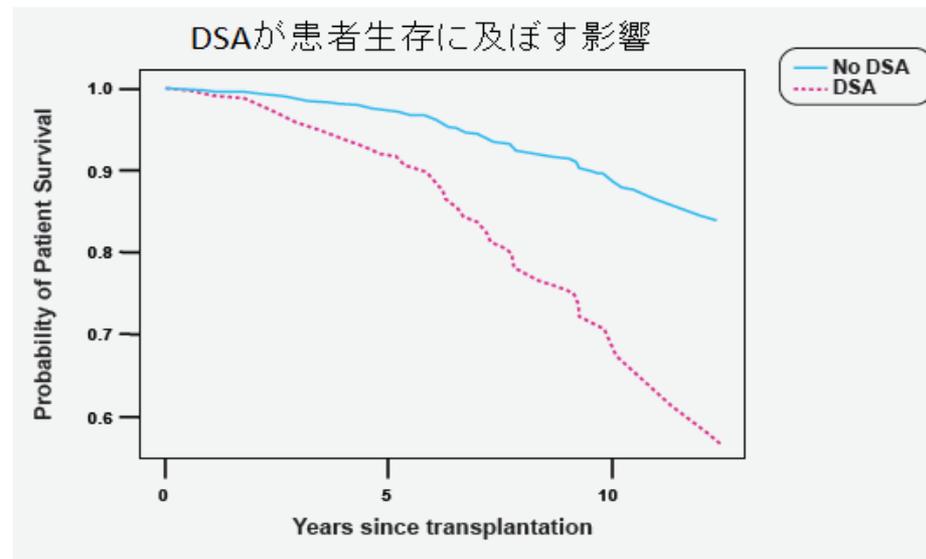
なぜ抗体検査を行うのか

- 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

DSAとは

- Donor Specific Antibodyの略
- DSAの存在は臓器生着に影響している
- LABScreen Single Antigen試薬により算出されるnMFIの値 (normalized Mean Fluorescence Intensity: One Lambda社) をもとにDSAの有無を議論されることが主流



患者生存率予測曲線は移植後の任意の時点で心移植レシピエントにおける *de novo* DSAが出現した場合とDSA非出現の場合の影響を示している。¹⁷

- 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

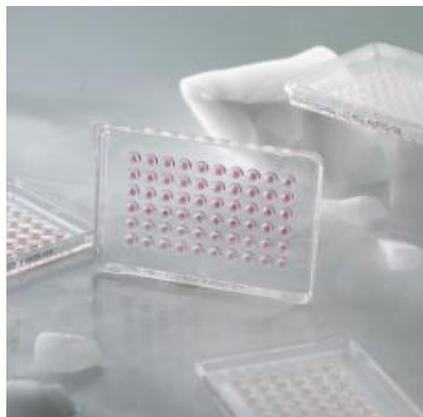
- 移植前に抗HLA抗体検査を実施した場合に4000点

- 全ての検査において、検査方法・試薬の指定はない

※ 2022年9月時点

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

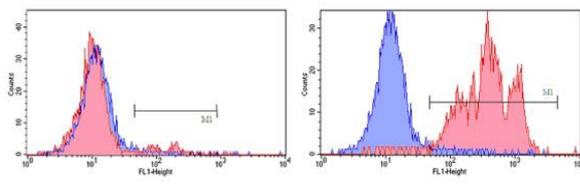


● ELISA法
(LAT)

● 細胞障害性試験



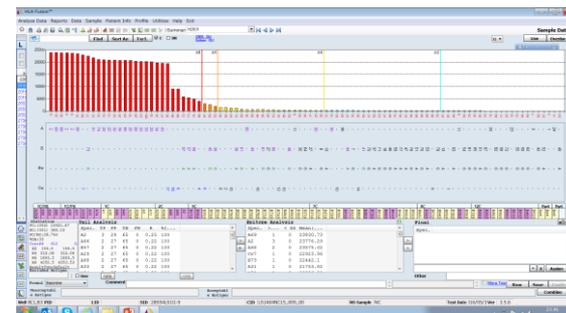
ANTIBODY
DETECTION



● フローサイト
メーター
(Flow PRA)



Luminexビーズ
(LABScreen)

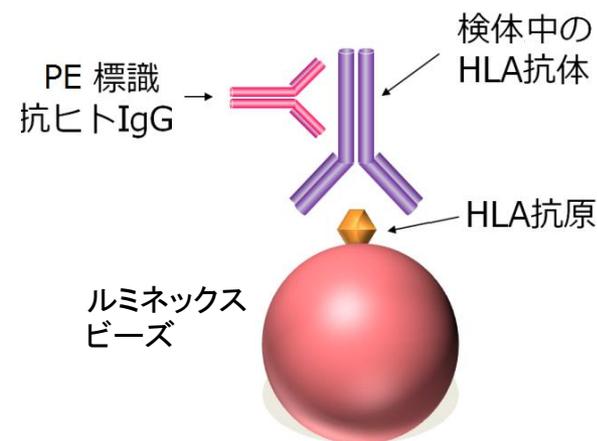


LABScreen試薬

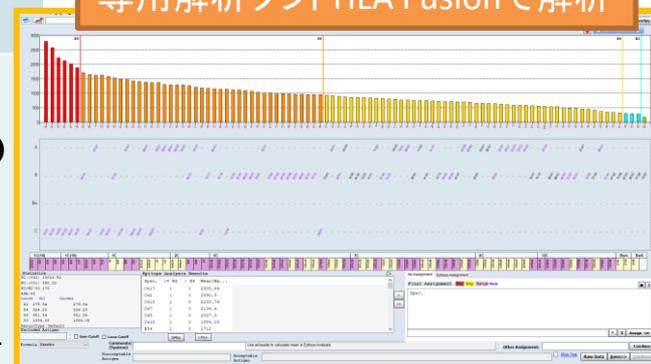
LABScreen試薬の種類

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) 	抗体特異性の同定 DSA(Donor Specific Antibody)の 検出 nMFI値の算出 <u>日本人に特有なHLA抗原を多く含む</u>

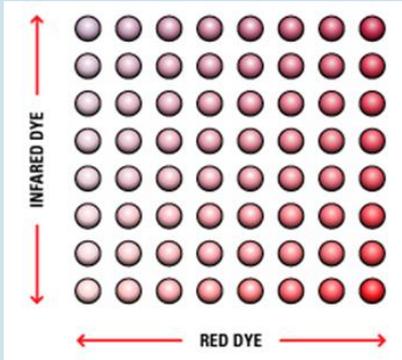
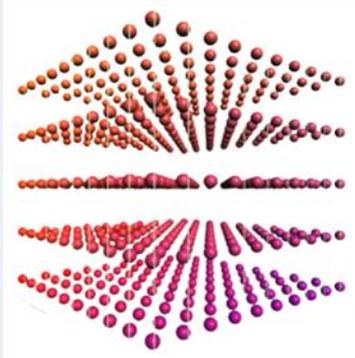
試薬の原理



専用解析ソフトHLA Fusionで解析



LABScreenの測定装置 (LABScan/医療機器)

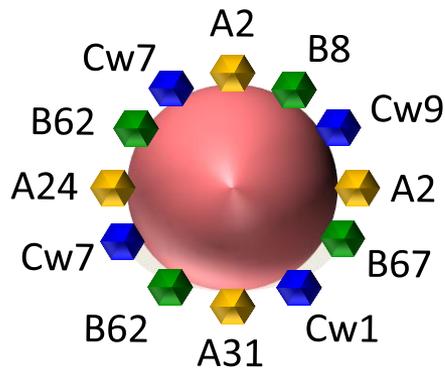
名称		ビーズ数	試薬
LABScan システム	 <p>(届出番号:13B3X10148000010)</p>	100色 (10 × 10) 	ExPlexは使用 不可
LABScan 3Dシステム	 <p>(届出番号:13B3X10148000020)</p>	500色 (10 × 10 × 5) 	全て使用可 能

Mixed, PRA, Single Antigenの違い

スクリーニング試薬

Mixed

17種ビーズ



Class1: 3パネル/1beads

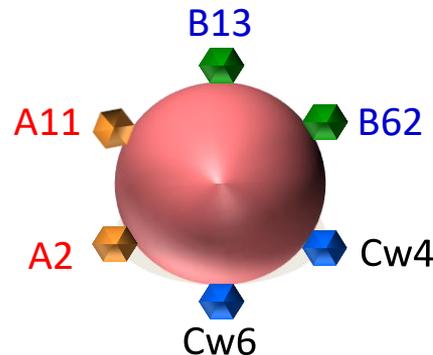
Class2: 5パネル/1beads

細胞株からの抽出抗原

PRA

Class1:56種ビーズ,

Class2:35種ビーズ



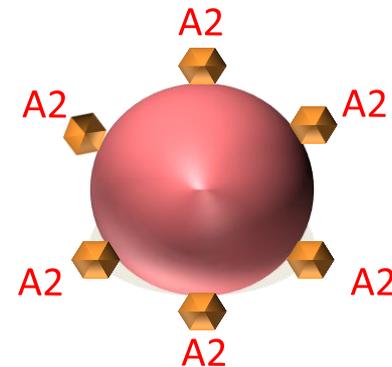
1パネル/1beads

特異性同定試薬

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Worksheetsをダウンロード

LABScreen Single Antigen HLA Class I - Combi

Catalog # LS1A04 Product Type Assays Target HLA-A, HLA-B, HLA-C

Add to List

Details

Regulatory: IVD: For In Vitro Diagnostic Use.

Technique: Flow Analysis

Use: Class I HLA A, B, and C antibodies in human sera

Storage Temperature: -65° C or below

Customer Notice: PE-Conjugated Goat Anti-Human IgG (Cat. # LS-AB2) and Negative Control Serum (Cat. # LS-NC) sold separately.

Package Includes: Bead Mix – 125 ml per vial, Wash Buffer, 10X – 13 ml

Product Support Files



Lot/Version

Worksheets/D...

EN-English

Search

Clear All

- Certificate of Analysis
- Luminex Templates
- Product Inserts/Instructions For Use
- Product Sheets/Brochure
- Reference Sheet/Tables
- SDS
- Software Analysis Files
- Worksheets/Datasheets

Title

LABScreen Single Anti-Worksheet

LABScreen Single Anti-Worksheet

LABScreen Single Anti-Worksheet

Type

Worksheets/Datasheets

Worksheets/Datasheets

Worksheets/Datasheets

ロットを確認してからダウンロード

ロット

Lot/Version	Publish Date	Download
013	05/14/2021	
012	01/13/2021	
010	10/07/2016	

Show 10 entries

< 1 >

WorkSheet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 IV	G0229	1	80	18	50	6	X	2	6	64
		E5732	1	29	8	45	6	X	6	7	
		E41074	1	69	8	55	6	X	1	7	
	Class IV	G0072	11	24	35	62	6	X	4	9	54
		E2934	2	24	54	67	6	X	1	7	
		G0313	2	31	62	67	6	X	7	X	
		E12627	2	24	60	46	6	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
 - 検査におけるバックグラウンドの補正
 - 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
- PCビーズ
 - 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
 - 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

再検査基準の確認(Summary画面)

Position /	Sample	System Comment	Analysis Date	Min BeadCnt	NC	PC	PCNCRatio
1(1,A1)	Unknown1		2021/07/30 9:59:30	100	75.78	11897.81	157.005
2(1,B1)	Unknown2	Low NC Raw Value.	2021/07/30 9:59:31	100	25.98	14107.37	543.009
3(1,C1)	Unknown3	Low NC Raw Value.	2021/07/30 9:59:31	100	24.25	15525.61	640.231
4(1,D1)	Unknown4	Low NC Raw Value.	2021/07/30 9:59:31	100	0.73	14333.48	19634.9

13

LABScreenの再検査基準

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

検査方法

全体の流れ

前処理

- 不純物を取り除くステップ

- 適切な前処理を行うことで、安定したデータを取得します
- 必要に応じて追加の前処理を行います

抗体とビーズの結合

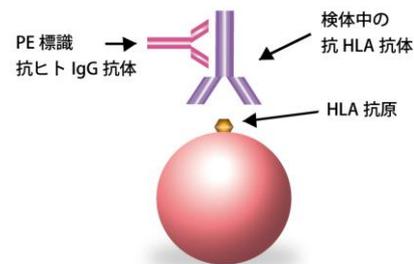
- 検体に含まれる抗体をビーズに結合させるステップ

- 抗原抗体反応の時間は正確に行うようにして下さい。時間が短いと十分なハイブリダイゼーションがされず、シグナルが低下する恐れがあります。また過剰な時間だと通常よりもMFIが高くなる可能性があります。
- ビーズは蛍光なので、遮光する事も大切です。

二次抗体反応

- 検出のための二次抗体を抗HLA抗体に結合させるステップ

- 二次抗体は用時調整をして下さい。
- 二次抗体は蛍光試薬なので、遮光を忘れないようにして下さい。



LABScanによる測定

- 専用装置にて各ビーズの蛍光値を測定

- 装置は測定前にCari/Veri、定期メンテナンス(Weekly, Monthly)を行うようにして下さい。
- 装置不具合で測定が出来な場合、検体調整後24時間、冷蔵、遮光で保存することで測定は可能です。

検体調整方法

前処理

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

反応

- ビーズ5 uLと検体20 uL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(用時調整)を加え遠心(1,300 g x 5分または1,500 g x 3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100 uLずつ添加
- 遮光、室温(20-25°C)で振とうしながら30分間反応

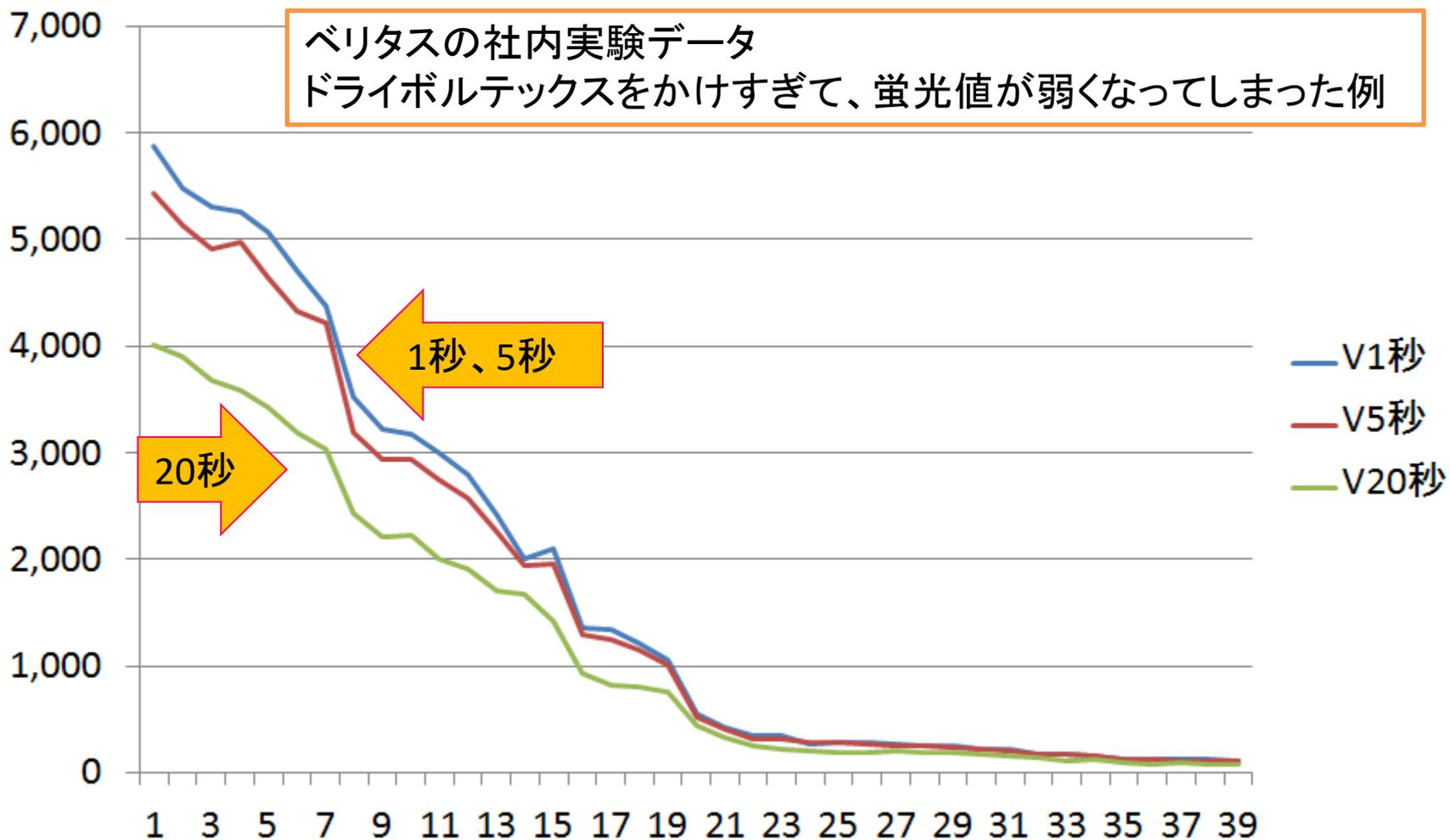
洗浄(2回)

- 洗浄バッファーを加え遠心(1,300 g x 5分または1,500 g x 3分)
- フリッキング、ドライボルテックス、タッピング

- 背景
 - 患者検体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(8,000～10,000 g、10分間以上)
 - 遠心後、中間層より検体を採取する
- 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



フリッキングとドライボルテックス

- 動画も作成しております

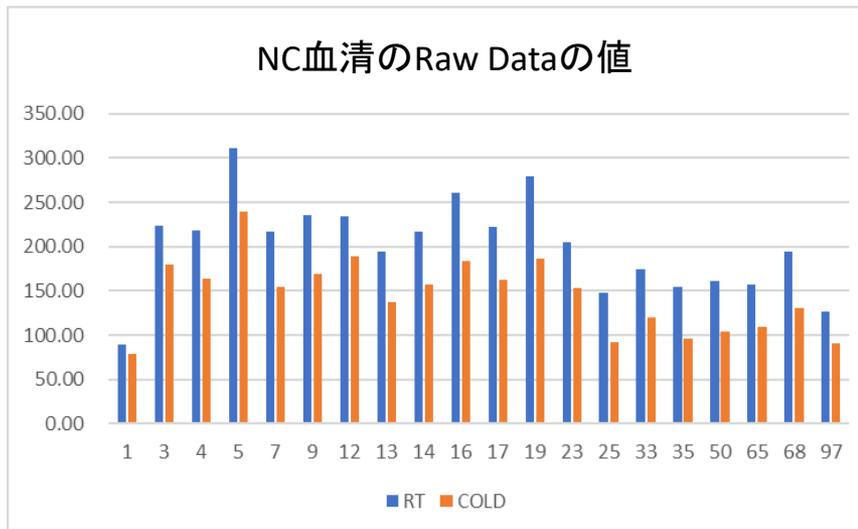
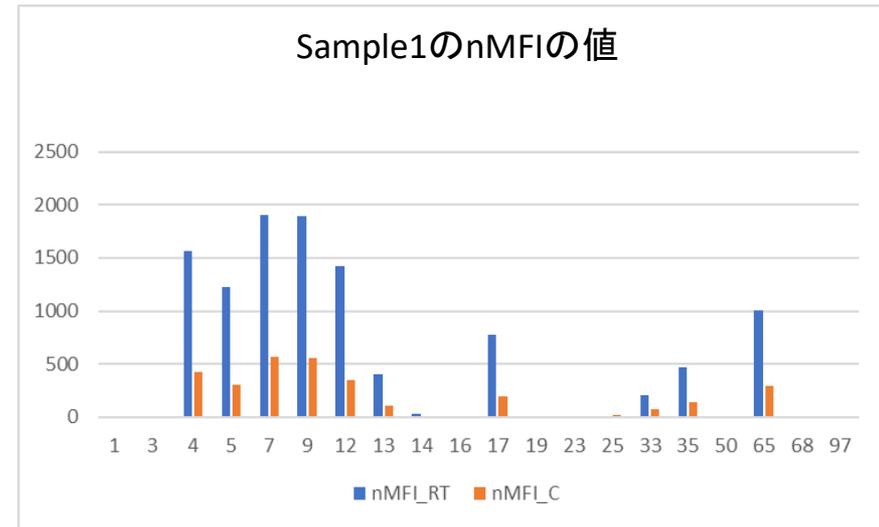
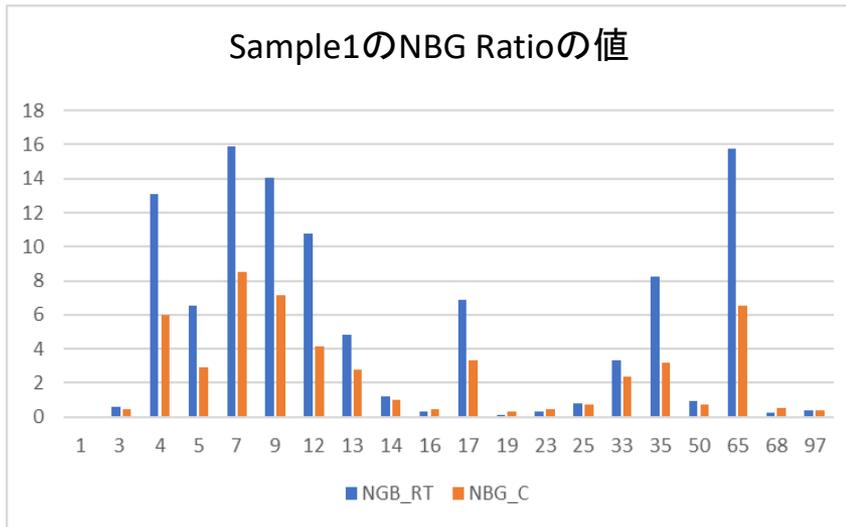


- https://www.veritask.co.jp/products/reference_detail/hla_protocol-flicking.html



- https://www.veritask.co.jp/products/reference_detail/hla_protocol-dry-vortex.html

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



冷蔵(C)と室温(RT)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