



# HLA検査のエッセンス Vol.2 抗HLA抗体検査

第1部 LABScreen試薬と手技

株式会社ベリタス

2024年10月30日

# 本日の内容

- LABScreen試薬の原理と種類
- LABScreen試薬の測定方法
- 検体の前処理



**VERITAS**

Veritas Corporation

# LABScreen試薬の原理と種類

DSA(Donor Specific Antibody)の存在は生存率に影響を及ぼす  
移植前後で抗体の有無を検査することが患者様の予後向上につながる

- 移植前

- 患者の体内にDSAが存在しないことの確認
- 存在する場合は、必要な治療を行ったあとに移植をする

- 移植後

- 定期的に抗体検査を行い、早期にDSAを検出することが重要

# 保険収載内容（2024/6更新）

## ・臓器移植

実施時期	検査内容	点数
移植前	スクリーニング検査 * 日本臓器移植ネットワークに登録している患者で輸血例、妊娠歴等から抗体陽性が疑われる場合、1年に1回実施可能	1,000点
	抗体特異性同定検査 * スクリーニング検査が陽性の場合、陽性のアレルを同定する	4,850点
移植時	抗HLA抗体検査	4,000点
移植後	スクリーニング検査 * 1年に1回実施可能	1,000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、陽性のアレルを同定する	4,850点

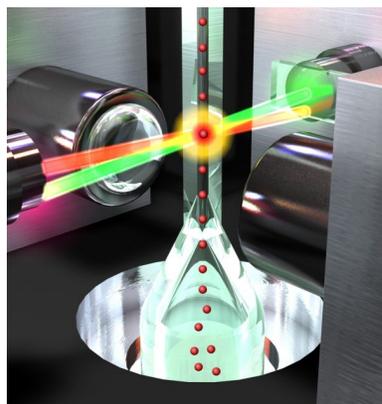
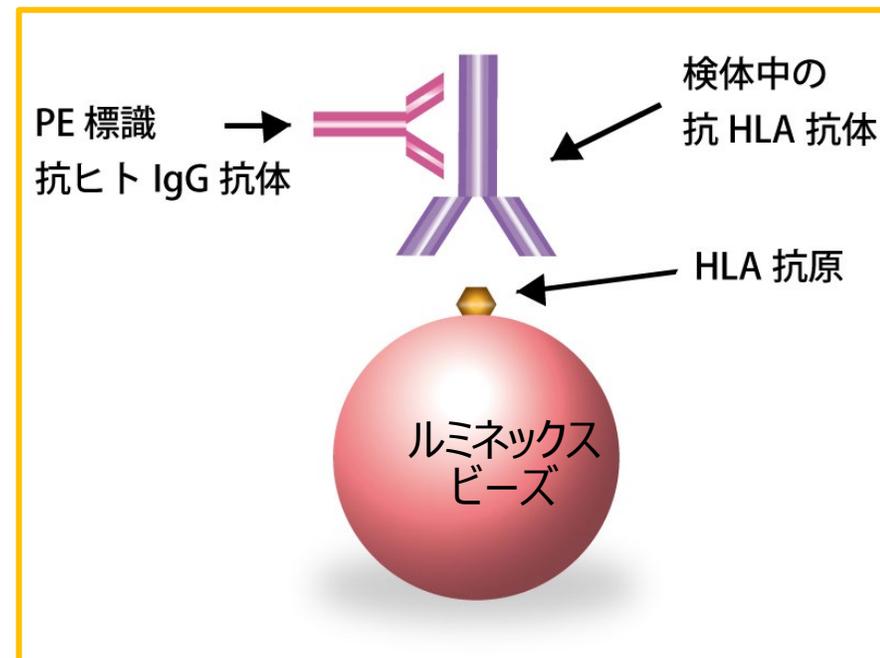
## ・造血幹細胞移植

– 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

# 試薬の原理

- ルミネックスビーズにHLA抗原が結合している
  - 全てのビーズは異なる色で着色され、番号が付番されている
- 検体中の抗HLA抗体とビーズ上のHLA抗原が結合
- 蛍光標識した抗ヒトIgG抗体（二次抗体）と検体中の抗HLA抗体が反応
- 二次抗体が反応したビーズと蛍光強度を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

# 試薬の種類

目的	試薬名
スクリーニング検査 抗体の有無の確認	LABScreen Mixed LABScreen PRA
特異性同定試薬 抗体の種類(アレル)の同定	LABScreen Single Antigen LABScreen Single Antigen Supplement LABScreen Single Antigen ExPlex

# Mixed、PRA、Single Antigenの違い

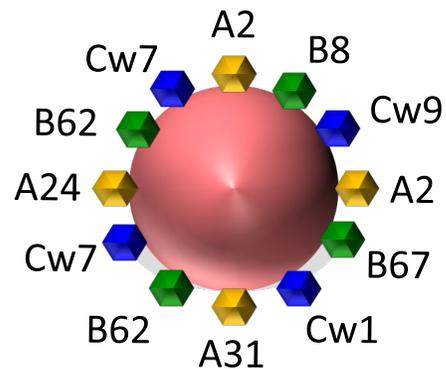
- ビーズに結合している抗原の種類と使用しているビーズの数が異なる

## 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

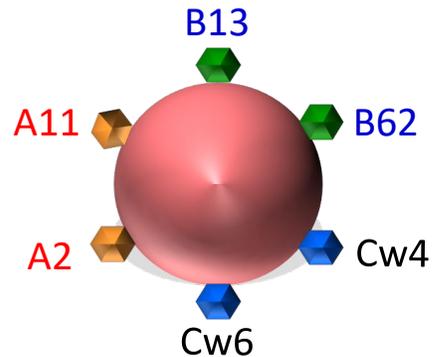
Class I: 3パネル/ビーズ  
Class II: 5パネル/ビーズ



ビーズの種類：17種

### PRA

1パネル/ビーズ



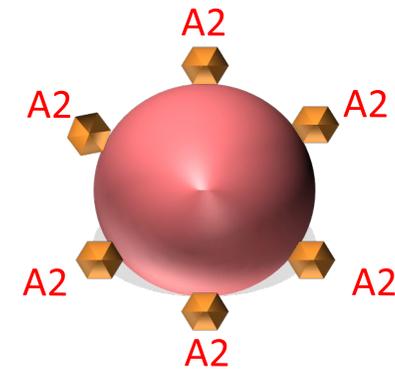
ビーズの種類：56種 (Class I)  
35種 (Class II)

## 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：97種 (Class I)  
95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 (One Lambda HPよりダウンロード可能)

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

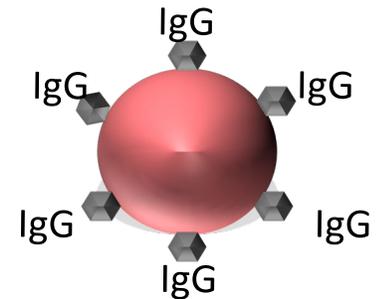
抗原ID

抗原情報

1抗原ビーズ

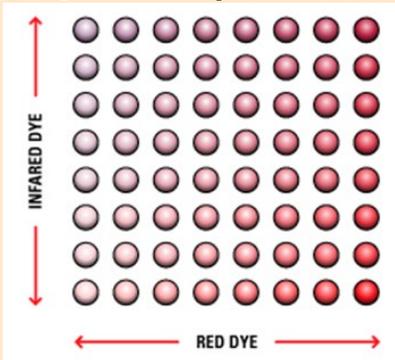
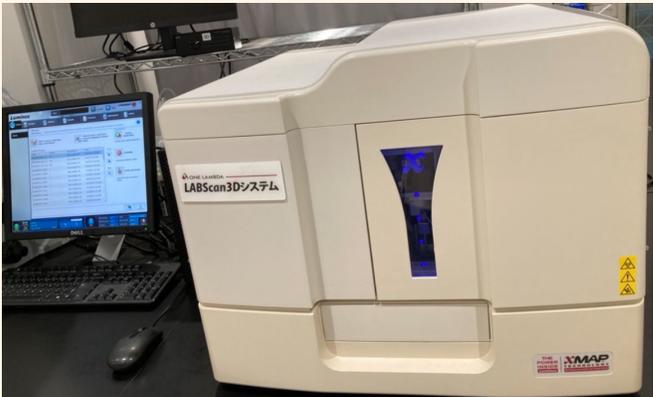
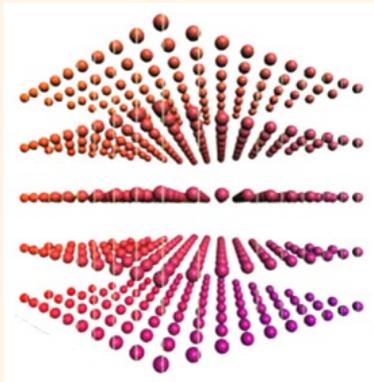
# NCビーズとPCビーズについて

- 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
  - 検査におけるバックグラウンドの補正
  - 検体に抗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が結合しており、二次抗体が必ず結合する
  - 蛍光値が正しく検出されていることが確認できる



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
		G0229	A1	A80	B18	B50	BW6	NA	CW2	CW6	

# 測定装置 (LABScan/医療機器)

名称		検出ができるビーズ数	使用できる試薬
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>



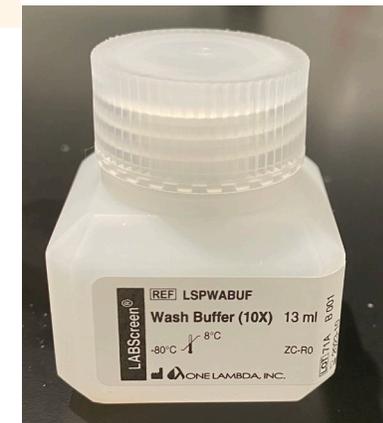
**VERITAS**

Veritas Corporation

# LABScreen試薬の測定方法

# キットに含まれる試薬

試薬名	注意点
Beads Bottle (ビーズ試薬)	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ 開封後は冷蔵・遮光保存</li><li>✓ 再凍結厳禁</li><li>✓ 解凍後3か月以内に使用</li><li>✓ 試薬の種類ごとに異なる</li></ul>
10X Wash Buffer	冷蔵保存 使用時に10倍希釈 全てのLABScreen試薬に共通

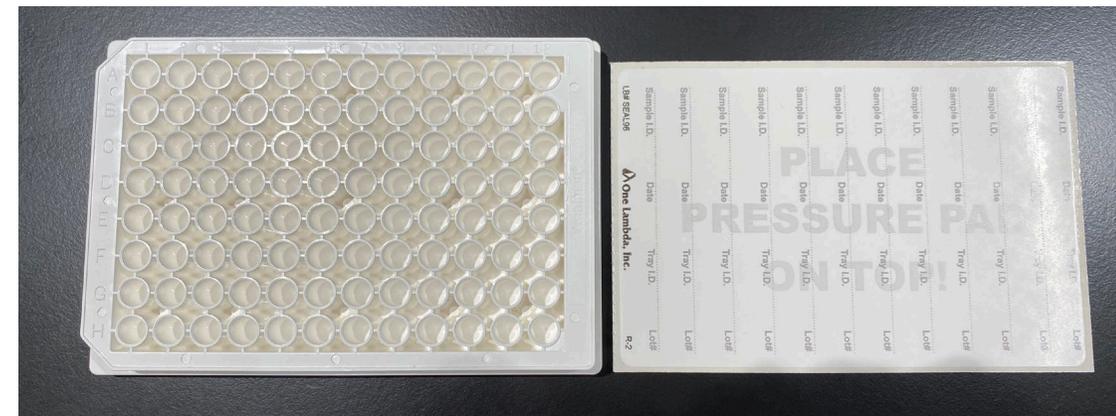


# LABScreenキット以外に必要な試薬

試薬名	型番	備考
PE-Conjugated Goat Anti-Human IgG	LS-AB2	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ 蛍光標識されたIgG抗体</li><li>✓ 1000検体分</li><li>✓ 開封前は冷蔵保存</li><li>✓ 滅菌水で希釈後、遮光で冷蔵保存し、6か月以内に使用</li></ul>
Negative Control Serum	LS-NC	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ 陰性コントロール血清</li><li>✓ 初回解凍時に小分け分注、-20°C以下で保存</li></ul>

# 試薬以外に必要なもの

- PBS(Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を含まない)
- 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 (1,500G回転が必要)
- チューブ遠心機
- ボルテックス
- LABScan/LABScan 3D



検体の前処理

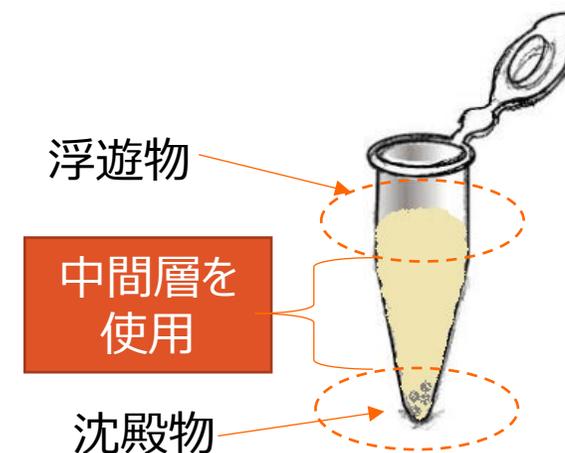
抗HLA抗体とビーズの反応

洗浄（3回）

二次抗体の結合、洗浄（2回）

LABScanで測定

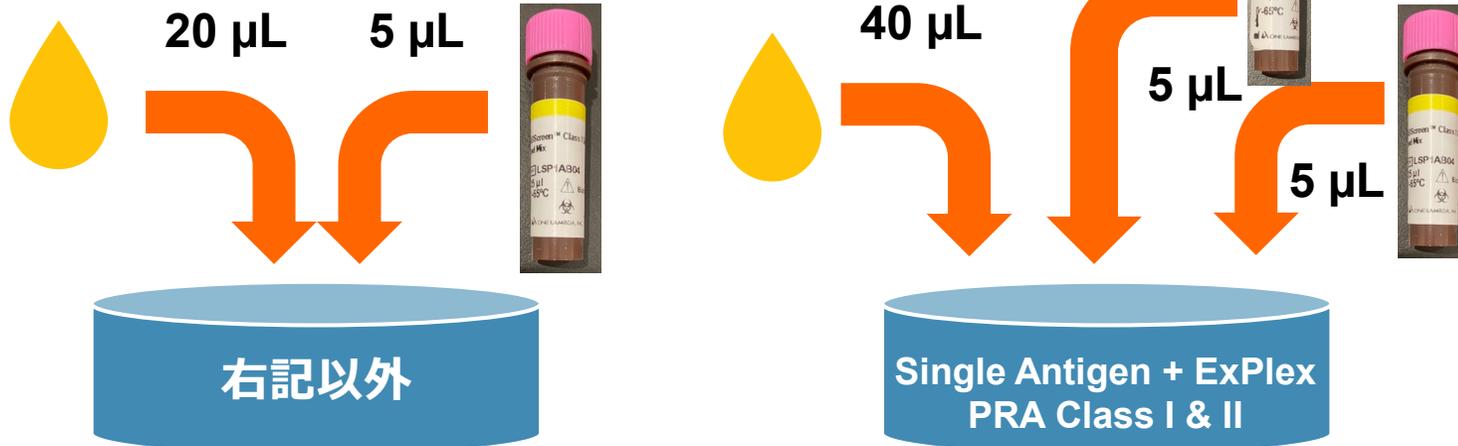
- 検体は血清を推奨（血漿の場合はACDまたはK-EDTA添加）
- 「凍結融解＋遠心」は必ず実施
  - 凍結後、室温で解凍、転倒混和
  - 遠心条件：8,000~10,000G、10分間以上
  - 中間層より検体を採取する
- 必要に応じて他の前処理を追加する



方法（太字はOne Lambda推奨）	目的	結果に与える影響
<b>Adsorb Out</b> 、FBS、超高速遠心	非特異タンパクを取り除く	NCビーズの値を下げる
PreSorb	非特異タンパクを取り除く	抗原ビーズの非特異反応を除去 NCビーズの値が下がる検体もある
<b>EDTA</b>	補体活性の影響を取り除く	PCビーズの値を上げる
DTT	IgMを取り除く	PCビーズの値を上げる

# 抗HLA抗体とビーズの反応-1

- 1番最初のWellに陰性コントロール血清 20  $\mu$ L、2番目以降のWellに検体20  $\mu$ Lを分注
    - 陰性コントロール血清は試薬ごとに必要
  - 各ウェルにビーズ試薬を5  $\mu$ L添加
- ※Single Antigen + Explex、またはPRA Class I+II の場合
- 検体40  $\mu$ L、各試薬ビーズ5  $\mu$ L混合

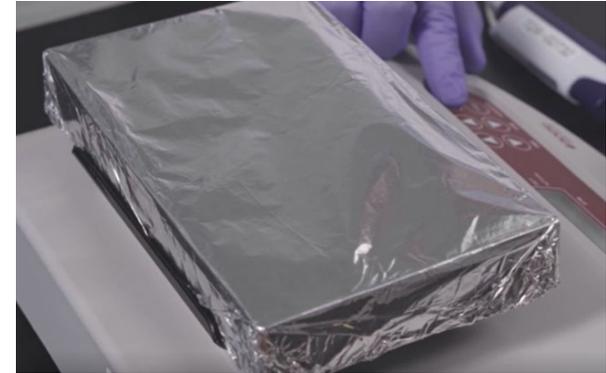


• ビーズ試薬はボルテックス & ピペッティングでしっかり混合する

# 抗HLA抗体とビーズの反応-2

- プレートにシールを貼り、遮光する
- 室温（20-25℃）で振とうしながら30分間反応

反応時間は正確に



- 反応中に10 x Wash bufferを精製水で希釈する
  - 必要量：1ウェルあたり約1.1mL

洗浄液の作り置きはしない  
常に同じ条件の洗浄溶液を使用

社内データ：冷蔵と室温の洗浄液で比較した結果、室温の方がnMFI、NBG Ratio共に高い  
→洗浄液の温度が測定結果に影響を与える

# 洗浄（3回）

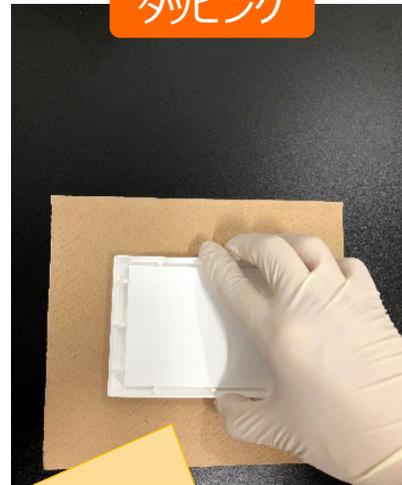
- 洗浄液を加える(1回目は150  $\mu$ L、2回目以降は200  $\mu$ Lを加える)
- 遠心（1,300G 5分、または1,500G 3分）
- フリッキング→タッピング→ドライボルテックス（2~5秒）
- 3回繰り返す

フリッキング



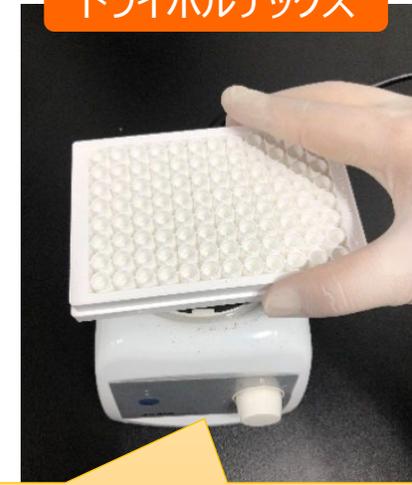
フリッキングは真下に1回のみ  
終了後トレーは下向きのままにする

タッピング



数回キムタオルに押し付ける  
（強く叩きつけない）

ドライボルテックス



ドライボルテックスの時間は  
常に一定に

# 動画で手順を説明しています

フリッキング、ドライボルテックス



ベリタス HLA 動画

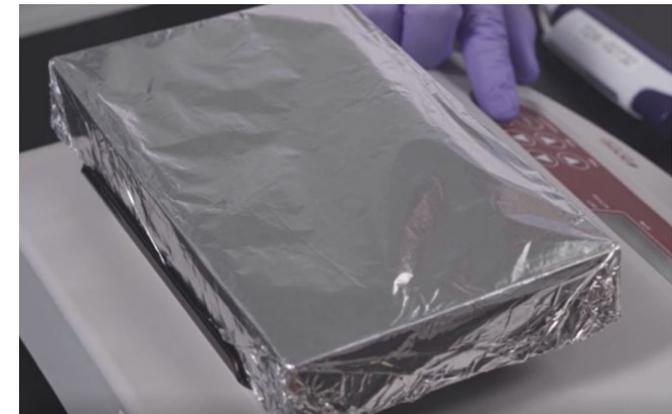


# 二次抗体の結合

- 二次抗体を洗浄液で100倍希釈
  - 3回目の洗浄時に調整をする
- 各ウェルに100 uLずつ添加
- プレートにシールを貼り、アルミホイル等で遮光する
- 室温（20-25°C）で振とうしながら30分間反応



二次抗体の希釈液は作り置きはしない  
希釈した後は使用まで遮光



# 洗浄 (3回)

- 1回目は洗浄液を加えずに遠心(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
  
- 2回目、3回目は洗浄液を200  $\mu$ L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  $\mu$ Lずつ添加しLABScanで測定

# LABScanによる測定-1

- 測定のためには、テンプレートファイルが必要
- 試薬の種類、ロットごとにテンプレートファイルが異なるため注意
  - 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)
  - 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

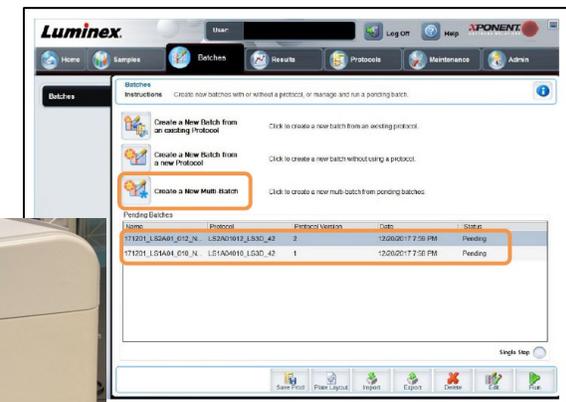
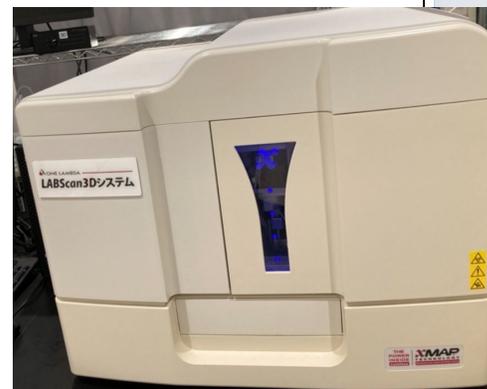


LABScreen試薬例	テンプレートファイル名	
Mixed (Lot026)	LSM12026_LS200_42[1].lxt LSM12026_LS3D_42[1].lxt	製品コード、製品ロット_LABScan機器_42[バージョン]
Single Antigen Class I(Lot015)	LS1A04015_LS200_42[1].lxt LS1A04015_LS3D_42[1].lxt	
PRA Class I (Lot021) & Class II (Lot020)	LS1PRA021_LS2PRA020_LS200_42[1].lxt LS1PRA021_LS2PRA020_LS3D_42[1].lxt	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]
Single Antigen Class I(Lot015) & ExPlex (Lot006)	LS1A04015_LS1AEX01006_LS3D_42[1].lxt	

# LABScanによる測定-2

- xPONENTでバッチファイルを作成して測定
  - 複数試薬を測定する場合は試薬ごとにバッチを作成し、マルチバッチを作成
- Outputフォルダに出力されたcsvファイルをHLA Fusionに読み込んで解析
- 検体調整後、すぐに測定が出来ない場合
  - プレートにシールを貼り遮光、冷蔵で24時間まで保存可能
  - 測定前に、ピペティングで混合する

- 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）





**VERITAS**

Veritas Corporation

# 検体の前処理

- NCビーズ
  - 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（非特異タンパク）の影響で高くなる
- PCビーズ
  - 低い場合は、検体内の抗HLA抗体がビーズに結合していない（偽陰性となっている）可能性があるため、常に同程度の値が検出されていることの確認が大切
  - 補体活性が高いことやIgMが含まれることが原因で低くなる

方法（太字はOne Lambda推奨）	目的	結果に与える影響
<b>Adsorb Out</b> 、FBS、超高速遠心	非特異タンパクを取り除く	NCビーズの値を下げる
PreSorb	非特異タンパクを取り除く	抗原ビーズの非特異反応を除去 NCビーズの値が下がる検体もある
<b>EDTA</b>	補体活性の影響を取り除く	PCビーズの値を上げる
DTT	IgMを取り除く	PCビーズの値を上げる

# 凍結融解→遠心（必ず行う）

- 目的
  - 血清/血漿中に含まれる不純物を取り除く
- 操作方法
  - 血清・血漿の凍結
    - 最短で-70℃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（8,000～10,000×g、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)

- 目的

- ラテックスに対する抗体を取り除く
  - ラテックスに対する抗体はNCビーズに結合し、NCビーズが高くなることがある

- 操作方法

- Adsorb Outビーズをボルテックス
- 検体血清30  $\mu$ LにAdsorb Outビーズ3  $\mu$ 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
- 15,000 rpm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を繰り返した時の蛍光値

	Neat	1x ADS	2x ADS	3x ADS	4x ADS
<b>NCビーズ</b>	4451	804	579	538	471
<b>PCビーズ</b>	7516	5115	3508	3833	3935
<b>PC/NC Ratio</b>	1.7	6.4	6.1	7.1	8.4
<b>抗体価の高いビーズ</b>	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

- 注意点

- 複数回の処理を行うことにより、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）
- 70-80%の検体で有効であると考えられている
- 検体によって処理にをすることによりNCビーズが上がる場合もある

- 目的

- ラテックスビーズやHLA抗原以外に対して産生された抗体を取り除く

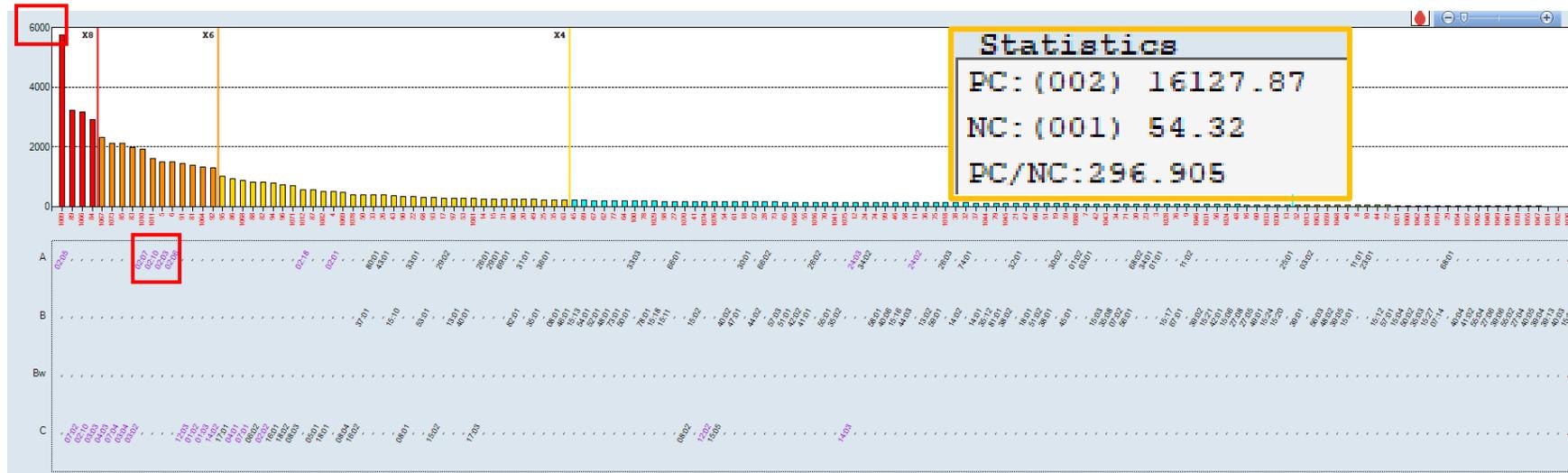
- 操作方法

- Presorb試薬を1分間ボルテックス
- PreSorb試薬25  $\mu$ Lを空のエッペンチューブに移し、室温で8,000~10,000 $\times$ gで1分間遠心する
- 上清を取り除く（ビーズを吸わない程度に、できる限り上清を除去する）
- 上清を取り除いたチューブに、血清25  $\mu$ Lを加える
- エッペンチューブの蓋をして、1分間ボルテックスで混合する
- 室温で10分間反応させる
- 反応後、室温で8,000~10,000 $\times$ gで1分間遠心する
- エッペンチューブをマグネット（DynaMag-2推奨）に置き1分間静置し、ビーズを吸わないように20  $\mu$ Lの上清を採取する

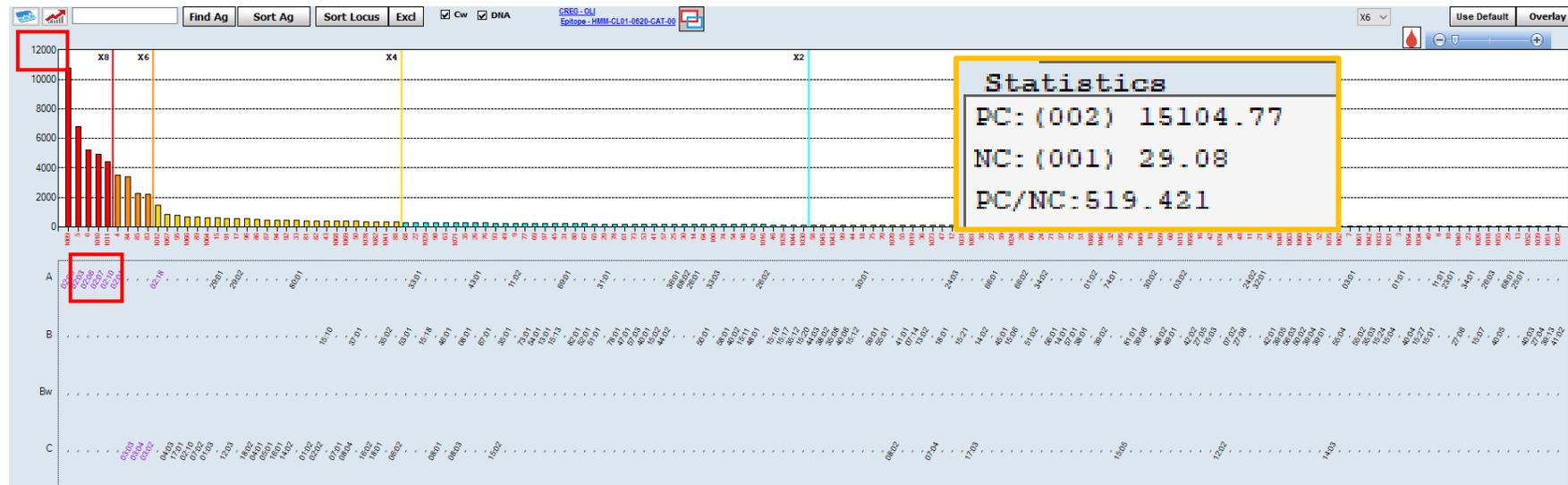


# Presorbのデータ例

処理前



処理後



# EDTA処理（One Lambda推奨）

- 目的

- 検体中に過剰な補体が存在する場合、二次抗体の反応が阻害され偽陰性となることがある（プロゾン様現象と呼ぶ）
- 補体活性経路に必要なCa<sup>2+</sup>をキレートすることで除去し、補体経路の活性化を抑え、偽陰性を防ぐ

- 操作方法

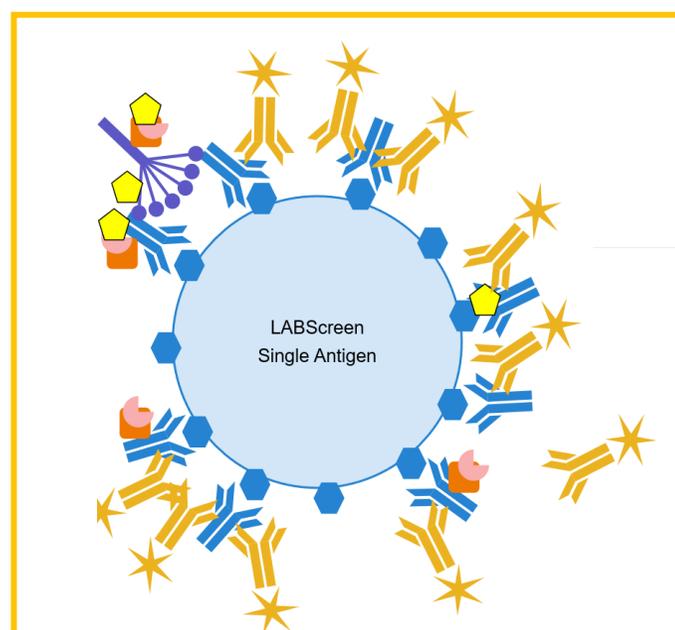
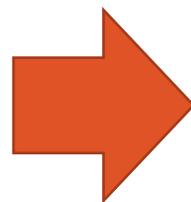
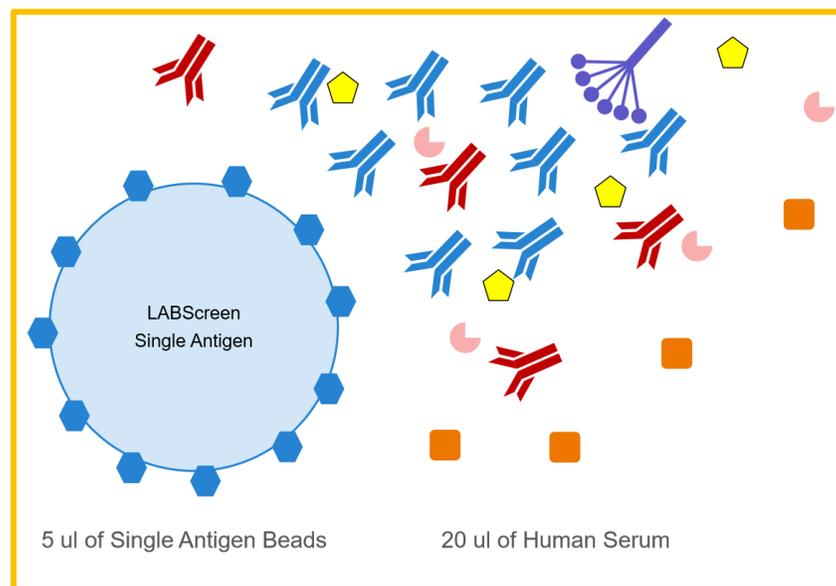
- 血清90 μLに0.5M EDTA(メーカー不問)2 μL添加
  - EDTAの濃度を約10 mMとなるように調整する
  - 水溶液のEDTAの利用を推奨
- 室温で30分間振とうしながら反応させる
- 20,000×gで10分間遠心、上清を使用

参考文献

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

# 試薬と血清の反応(通常の検体の場合)

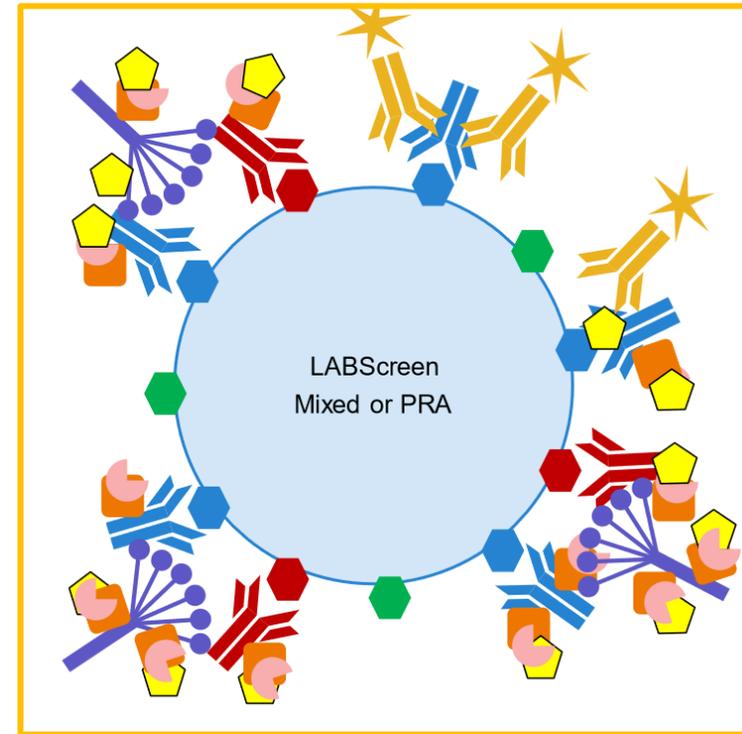
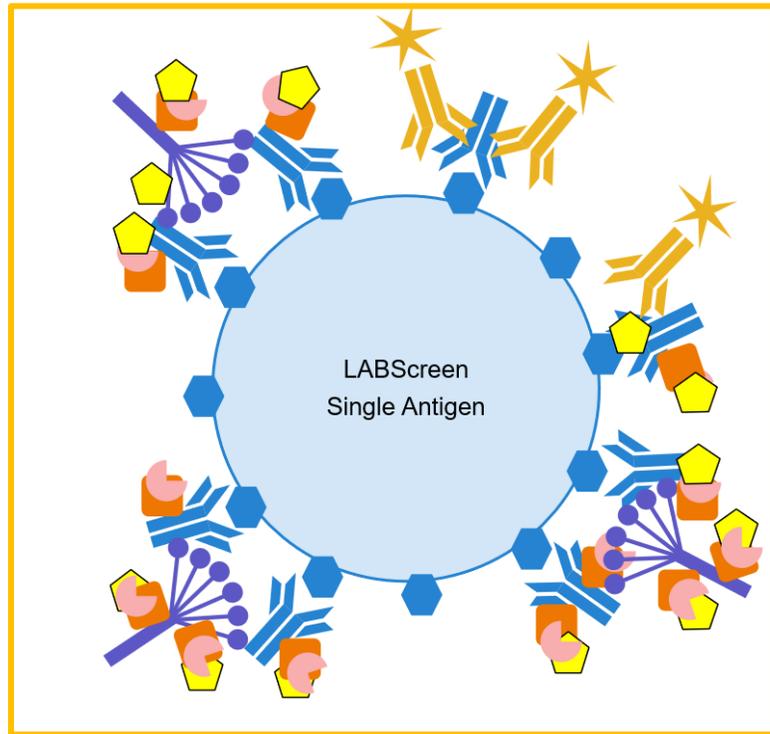
補体活性が低い場合は、二次抗体が抗HLA抗体に結合できるのでnMFIの値に影響を与えない



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

# 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）  
測定結果からプロゾーン様現象が起こっているか否かは判断できないため注意  
→前処理を行い、測定結果に変化が見られればプロゾーン様現象が起こっていたことがわかる

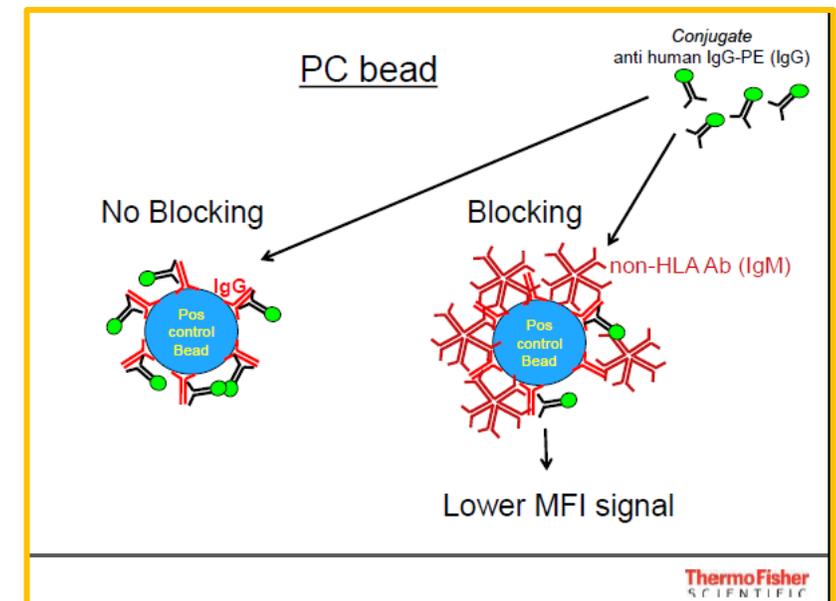
- 目的

- IgM抗体が検体内に存在する場合、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し、偽陰性を防ぐ

- 操作方法

- 血清90  $\mu\text{L}$  にDTT溶液 (0.05M) 10  $\mu\text{L}$ 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
- 8,000~10,000 $\times g$ 、10分間遠心

出典 : ASHI LABORATORY MAMUAL Fourth Edition



出典 : One Lambda

- 目的
  - 非特異タンパクを取り除く
- 操作方法
  - 検体血清100  $\mu$ Lに対し、非動化したFBSを3  $\mu$ L添加
  - 37°C、20-30分間インキュベート
  - 10,000 $\times$ 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

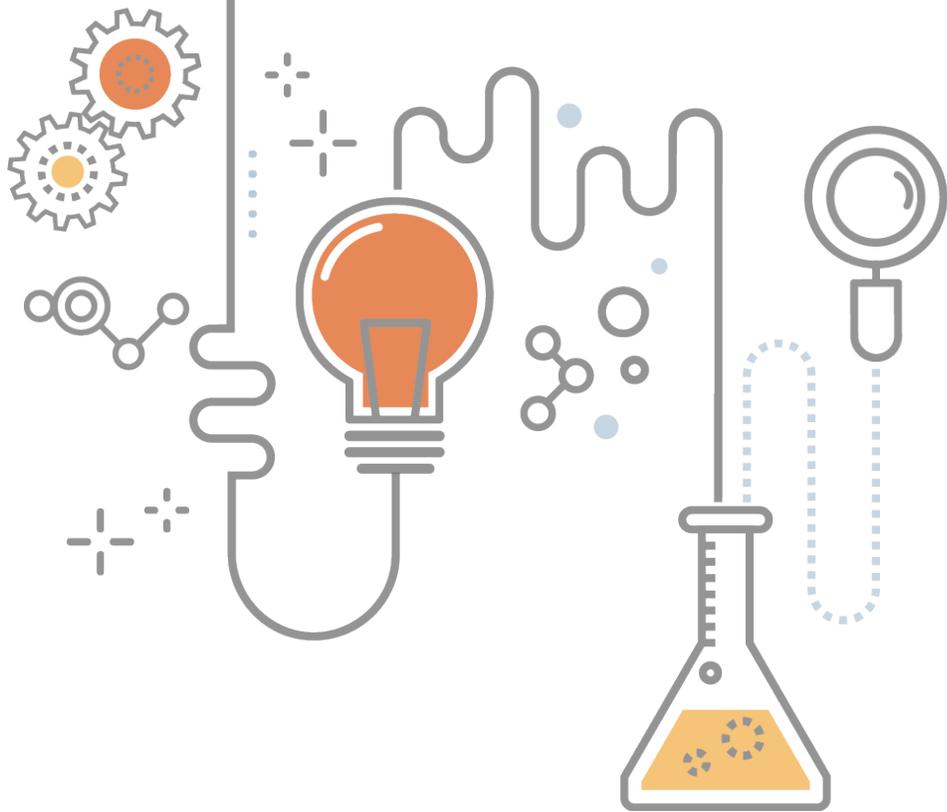
## 参考文献

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.

- 目的
  - 検体をPBS等で希釈することにより、非特異反応やプロゾン様現象を回避する
- 操作方法
  - PBSを用いて希釈
  - 希釈倍率の指定はない
- 注意点
  - 希釈によりHLA抗体の濃度も薄くなっていることを考慮して解析する

# 前処理方法の一覧

方法（太字はOne Lambda推奨）	目的	結果に与える影響
<b>Adsorb Out</b> 、FBS、超高速遠心	非特異タンパクを取り除く	NCビーズの値を下げる
PreSorb	非特異タンパクを取り除く	抗原ビーズの非特異反応を除去 NCビーズの値が下がる検体もある
<b>EDTA</b>	補体活性の影響を取り除く	PCビーズの値を上げる
DTT	IgMを取り除く	PCビーズの値を上げる



ご清聴ありがとうございました。