

第2回関東HLA研究会学術集会

【ワークショップ】

**蛍光ビーズ法HLA抗体検査試薬の
半量法に関するワークショップ**

中島文明

日本赤十字社 中央血液研究所 研究開発部

2018年6月9日（土）

東京大学本郷キャンパス医学部 1号館 3階講堂

序 論

昨年、公表された論文では、LABScreen Single Antigen (LS-SA) 試薬について操作全体の効率化を検討し約70%の時間短縮を達成したとされる。その中で、ビーズも標準量と半量で扱っているが、なぜか双方の明確な比較はされていない (Hum Immunol 78, 2017)。本研究会では、ビーズ量の違いが試薬性能に影響するか複数施設で検証することにした。

参加11施設に対し、4種類のHLA抗血清を共通配布した。各施設はビーズを標準量と半量でそれぞれ測定した。LS-SA試薬は、クラスIが全てLot.010、クラスIIがLot.011と012半々であった。可能な限り施設間のバイアスを排除したいため、抗血清は未処理のまま使用し、操作はメーカーの **instruction manual** に従うように指示した。

様々な組み合わせで、ビーズ標準量と半量の測定結果を比較すると、ピアソンの積率相関係数や線形回帰直線等の数値データは、どの施設も良好に見えた。しかしながら、**Raw data** で比較するとバックグラウンド・シグナルのバラツキなど操作環境の影響は十分に排除できていない。バックグラウンドの制御が相関に影響することも認められた。集会では、このような様々な観点の解析結果を提示するが、半量法の可否に関しては、その使用目的を踏まえた上で各施設の判断に委ねたい。

はじめに

ダルハウジー大学 (カナダ)

Rapid optimized FCXM assay

Halifax protocol (less than 40 min)

Halifaster protocol

Rapid optimized SAB assay

ROB protocol (25 min)

➡ **分析評価時間の短縮が目的**

It's about time: The development and validation of a rapid optimized single antigen bead (ROB) assay protocol for LABScreen

Robert S. Liwski ^a, Anna L. Greenshields ^a, Cathi Murphey ^b, Robert A. Bray ^c, Howard M. Gebel ^c

^a Department of Pathology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia B3H 1V8, Canada

^b Southwest Immunodiagnostics Inc., San Antonio, San Antonio, TX 78229, USA

^c Department of Pathology, Emory University Hospital, Atlanta, GA 30322, USA



Human Immunology 78 (2017) 489–499

Comparison of LABScreen SAB protocols

Parameter	One Lambda LABScreen SAB (OLSAB)	Rapid Optimized SAB (ROB)
EDTA treatment	Yes	Yes
Serum volume	20 μ l	25 μ l
SAB volume	2.5–5 μ L	2.5–5 μ L
First incubation time	30 min	15 min
Washes (1st set) anti-IgG PE concentration	3 \times 5 min at 1800 \times g 1:100, 100 μ l/test	3 \times 1 min at 1800 \times g 1:10, 20 μ l/test
Second incubation time	30 min	5 min
Washes (2nd set)	2 \times 5 min at 1800 \times g	2 \times 1 min 1800 \times g
Final suspension volume	80 μ l	55 μ l
Total assay time	85 min	25 min

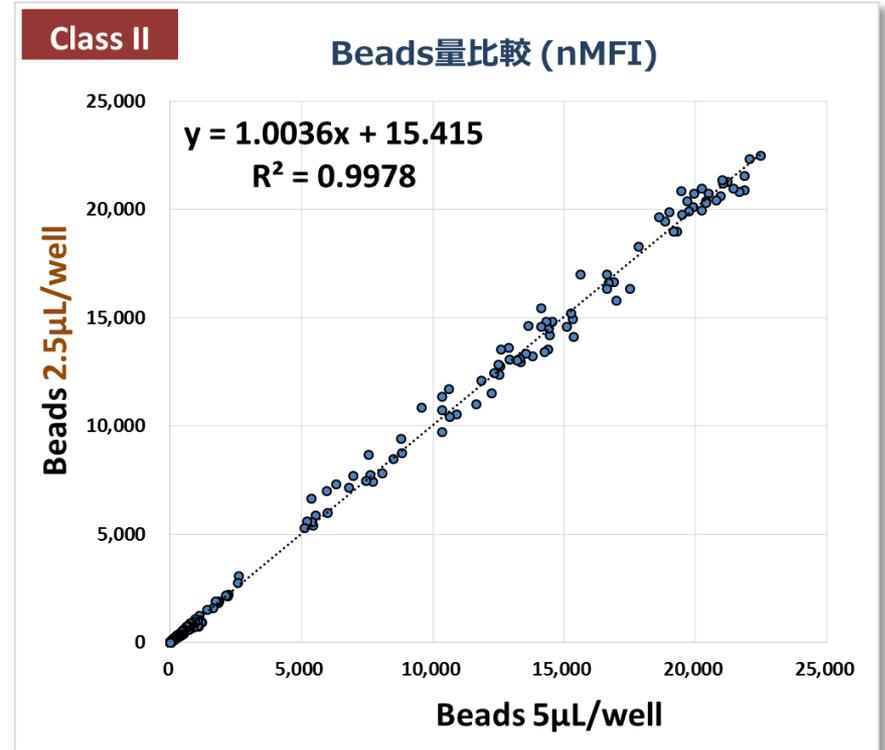
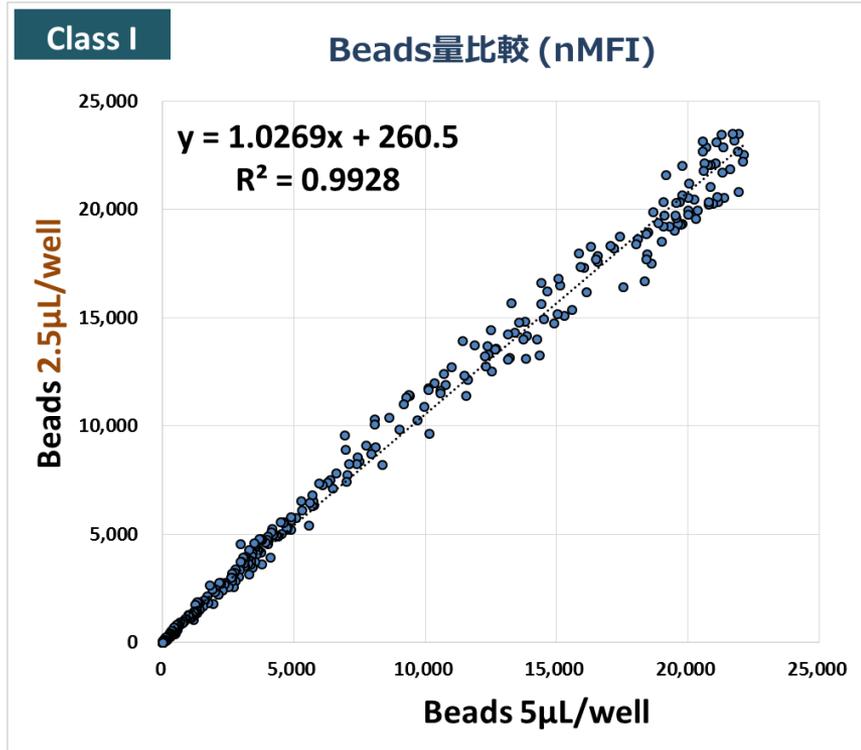
Liwski RS, et al. Hum Immunol. 78 (2017) 489–499

time↓

amount↓

amount, dil.↑

Beads量5 μ L \rightarrow 2.5 μ Lの事前調査



Parameter	One Lambda LABScreen SAB (OLSAB)	Rapid Optimized SAB (ROB)
Serum volume	20 μ l	25 μ l
anti-IgG PE	1:100, 100 μ l/test	1:10, 20 μ l/test

ビーズを減量しても、このままで問題ない！

蛍光ビーズ法HLA抗体検査試薬の半量法に関するワークショップ

実施要項

[試薬]：参加施設負担

LABScreen Single Antigen HLA Class I - Combi (One Lambda #LS1A04)

LABScreen Single Antigen HLA Class II - Group 1 (One Lambda #LS2A01)

PE-Conjugated Goat Anti-Human IgG (One Lambda #LS-AB2)

※陰性コントロール血清は使用せず、ソフトウェア既定値参照

[検体]：既知HLA抗血清0.5mL×4本を配布

[方法]：参加各施設で実施

各抗血清についてビーズ標準量5 μ Lと半量2.5 μ Lで同時測定する

測定データ（ルミネックスのoutput.csv）を2018年2月28日（水）締切りで提出

[集計・解析]：日本赤十字社中央血液研究所

HLA Fusion Software VERSION 4.1 (One Lambda)

nMFI値、ビーズ・カウント数など解析用データを抽出

ビーズ標準量5 μ Lと半量2.5 μ Lの相関解析、ビーズ・カウント数、測定時間、施設間差などを解析

蛍光ビーズ法HLA抗体検査試薬の半量法に関するワークショップ

[操作上の注意点] :

◆ 測定前の抗血清の処理方法

測定条件を一定に保つため、送付した状態のまま、転倒混和とスピンドウンで測定
強遠心、EDTA処理、凍結融解などの前処置を行わない！

◆ 操作手順

- 原則，試薬に添付されている取扱説明書（Product Insert; LS-LSCN-PI-EN-00）に従う
- ビーズ量以外は、すべて同一条件で操作
- 抗血清を分注してからビーズを分注する
- 陰性コントロール血清は測定しない（ソフトウェア既定値参照で解析）
- 同一バッチに他の測定を混在させない

◆ ルミネックス測定サンプル名のルール

サンプル名 = 抗血清名 (K1~K4) +

HLAクラス (C1 : クラスI、C2 : クラス2) +

ビーズ量 (S : 標準量5 μ L、H : 半量2.5 μ L)

K1C1S K2C1S K3C1S K4C1S K1C1H K2C1H K3C1H K4C1H

K1C2S K2C2S K3C2S K4C2S K1C2H K2C2H K3C2H K4C2H

◆ 施設コード

P01~P11 : 中央血液研究所でランダム発番し該当施設に個別通知

K1~K4 HLA抗体特異性

HLA Specificity	Molecular Specificity	%PRA nMFI>=5,000
A1	A*01:01	
A2	A*02:01	
A2	A*02:06	
A3	A*03:01	
A11	A*11:01	
A11	A*11:02	
A24	A*24:02	
A26	A*26:01	
A30	A*30:01	
A31	A*31:01	
A33	A*33:03	
B13	B*13:01	
B13	B*13:02	
B37	B*37:01	
B44	B*44:02	
B44	B*44:03	
B51	B*51:01	
B51	B*51:02	
B52	B*52:01	
B59	B*59:01	
B59	B*59:02	
B62	B*62:01	
B62	B*62:02	
B62	B*62:03	
B62	B*62:04	
B62	B*62:05	
B62	B*62:06	
B62	B*62:07	
B62	B*62:08	
B62	B*62:09	
B62	B*62:10	
B62	B*62:11	
B62	B*62:12	
B62	B*62:13	
B62	B*62:14	
B62	B*62:15	
B62	B*62:16	
B62	B*62:17	
B62	B*62:18	
B62	B*62:19	
B62	B*62:20	
B62	B*62:21	
B62	B*62:22	
B62	B*62:23	
B62	B*62:24	
B62	B*62:25	
B62	B*62:26	
B62	B*62:27	
B62	B*62:28	
B62	B*62:29	
B62	B*62:30	
B62	B*62:31	
B62	B*62:32	
B62	B*62:33	
B62	B*62:34	
B62	B*62:35	
B62	B*62:36	
B62	B*62:37	
B62	B*62:38	
B62	B*62:39	
B62	B*62:40	
B62	B*62:41	
B62	B*62:42	
B62	B*62:43	
B62	B*62:44	
B62	B*62:45	
B62	B*62:46	
B62	B*62:47	
B62	B*62:48	
B62	B*62:49	
B62	B*62:50	
B62	B*62:51	
B62	B*62:52	
B62	B*62:53	
B62	B*62:54	
B62	B*62:55	
B62	B*62:56	
B62	B*62:57	
B62	B*62:58	
B62	B*62:59	
B62	B*62:60	
B62	B*62:61	
B62	B*62:62	
B62	B*62:63	
B62	B*62:64	
B62	B*62:65	
B62	B*62:66	
B62	B*62:67	
B62	B*62:68	
B62	B*62:69	
B62	B*62:70	
B62	B*62:71	
B62	B*62:72	
B62	B*62:73	
B62	B*62:74	
B62	B*62:75	
B62	B*62:76	
B62	B*62:77	
B62	B*62:78	
B62	B*62:79	
B62	B*62:80	
B62	B*62:81	
B62	B*62:82	
B62	B*62:83	
B62	B*62:84	
B62	B*62:85	
B62	B*62:86	
B62	B*62:87	
B62	B*62:88	
B62	B*62:89	
B62	B*62:90	
B62	B*62:91	
B62	B*62:92	
B62	B*62:93	
B62	B*62:94	
B62	B*62:95	
B62	B*62:96	
B62	B*62:97	
B62	B*62:98	
B62	B*62:99	
B62	B*62:100	
B62	B*62:101	
B62	B*62:102	
B62	B*62:103	
B62	B*62:104	
B62	B*62:105	
B62	B*62:106	
B62	B*62:107	
B62	B*62:108	
B62	B*62:109	
B62	B*62:110	
B62	B*62:111	
B62	B*62:112	
B62	B*62:113	
B62	B*62:114	
B62	B*62:115	
B62	B*62:116	
B62	B*62:117	
B62	B*62:118	
B62	B*62:119	
B62	B*62:120	
B62	B*62:121	
B62	B*62:122	
B62	B*62:123	
B62	B*62:124	
B62	B*62:125	
B62	B*62:126	
B62	B*62:127	
B62	B*62:128	
B62	B*62:129	
B62	B*62:130	
B62	B*62:131	
B62	B*62:132	
B62	B*62:133	
B62	B*62:134	
B62	B*62:135	
B62	B*62:136	
B62	B*62:137	
B62	B*62:138	
B62	B*62:139	
B62	B*62:140	
B62	B*62:141	
B62	B*62:142	
B62	B*62:143	
B62	B*62:144	
B62	B*62:145	
B62	B*62:146	
B62	B*62:147	
B62	B*62:148	
B62	B*62:149	
B62	B*62:150	
B62	B*62:151	
B62	B*62:152	
B62	B*62:153	
B62	B*62:154	
B62	B*62:155	
B62	B*62:156	
B62	B*62:157	
B62	B*62:158	
B62	B*62:159	
B62	B*62:160	
B62	B*62:161	
B62	B*62:162	
B62	B*62:163	
B62	B*62:164	
B62	B*62:165	
B62	B*62:166	
B62	B*62:167	
B62	B*62:168	
B62	B*62:169	
B62	B*62:170	
B62	B*62:171	
B62	B*62:172	
B62	B*62:173	
B62	B*62:174	
B62	B*62:175	
B62	B*62:176	
B62	B*62:177	
B62	B*62:178	
B62	B*62:179	
B62	B*62:180	
B62	B*62:181	
B62	B*62:182	
B62	B*62:183	
B62	B*62:184	
B62	B*62:185	
B62	B*62:186	
B62	B*62:187	
B62	B*62:188	
B62	B*62:189	
B62	B*62:190	
B62	B*62:191	
B62	B*62:192	
B62	B*62:193	
B62	B*62:194	
B62	B*62:195	
B62	B*62:196	
B62	B*62:197	
B62	B*62:198	
B62	B*62:199	
B62	B*62:200	
B62	B*62:201	
B62	B*62:202	
B62	B*62:203	
B62	B*62:204	
B62	B*62:205	
B62	B*62:206	
B62	B*62:207	
B62	B*62:208	
B62	B*62:209	
B62	B*62:210	
B62	B*62:211	
B62	B*62:212	
B62	B*62:213	
B62	B*62:214	
B62	B*62:215	
B62	B*62:216	
B62	B*62:217	
B62	B*62:218	
B62	B*62:219	
B62	B*62:220	
B62	B*62:221	
B62	B*62:222	
B62	B*62:223	
B62	B*62:224	
B62	B*62:225	
B62	B*62:226	
B62	B*62:227	
B62	B*62:228	
B62	B*62:229	
B62	B*62:230	
B62	B*62:231	
B62	B*62:232	
B62	B*62:233	
B62	B*62:234	
B62	B*62:235	
B62	B*62:236	
B62	B*62:237	
B62	B*62:238	
B62	B*62:239	
B62	B*62:240	
B62	B*62:241	
B62	B*62:242	
B62	B*62:243	
B62	B*62:244	
B62	B*62:245	
B62	B*62:246	
B62	B*62:247	
B62	B*62:248	
B62	B*62:249	
B62	B*62:250	
B62	B*62:251	
B62	B*62:252	
B62	B*62:253	
B62	B*62:254	
B62	B*62:255	
B62	B*62:256	
B62	B*62:257	
B62	B*62:258	
B62	B*62:259	
B62	B*62:260	
B62	B*62:261	
B62	B*62:262	
B62	B*62:263	
B62	B*62:264	
B62	B*62:265	
B62	B*62:266	
B62	B*62:267	
B62	B*62:268	
B62	B*62:269	
B62	B*62:270	
B62	B*62:271	
B62	B*62:272	
B62	B*62:273	
B62	B*62:274	
B62	B*62:275	
B62	B*62:276	
B62	B*62:277	
B62	B*62:278	
B62	B*62:279	
B62	B*62:280	
B62	B*62:281	
B62	B*62:282	
B62	B*62:283	
B62	B*62:284	
B62	B*62:285	
B62	B*62:286	
B62	B*62:287	
B62	B*62:288	
B62	B*62:289	
B62	B*62:290	
B62	B*62:291	
B62	B*62:292	
B62	B*62:293	
B62	B*62:294	
B62	B*62:295	
B62	B*62:296	
B62	B*62:297	
B62	B*62:298	
B62	B*62:299	
B62	B*62:300	
B62	B*62:301	
B62	B*62:302	
B62	B*62:303	
B62	B*62:304	
B62	B*62:305	
B62	B*62:306	
B62	B*62:307	
B62	B*62:308	
B62	B*62:309	
B62	B*62:310	
B62	B*62:311	
B62	B*62:312	
B62	B*62:313	
B62	B*62:314	
B62	B*62:315	
B62	B*62:316	
B62	B*62:317	
B62	B*62:318	
B62	B*62:319	
B62	B*62:320	
B62	B*62:321	
B62	B*62:322	
B62	B*62:323	
B62	B*62:324	
B62	B*62:325	
B62	B*62:326	
B62	B*62:327	
B62	B*62:328	
B62	B*62:329	
B62	B*62:330	
B62	B*62:331	
B62	B*62:332	
B62	B*62:333	
B62	B*62:334	
B62	B*62:335	
B62	B*62:336	
B62	B*62:337	
B62	B*62:338	
B62	B*62:339	
B62	B*62:340	
B62	B*62:341	
B62	B*62:342	
B62	B*62:343	
B62	B*62:344	
B62	B*62:345	
B62	B*62:346	
B62	B*62:347	
B62	B*62:348	
B62	B*62:349	
B62	B*62:350	
B62	B*62:351	
B62	B*62:352	
B62	B*62:353	
B62	B*62:354	

比較

施設間差

HLA Class I & II

Sample

試薬Lot. (Class IIのみ)

数値データ

(Raw Data, nMFI, RXN, NGB ratio, Beads count, Control Beads)

反応領域

(Gray zone / 弱・強反応領域など)

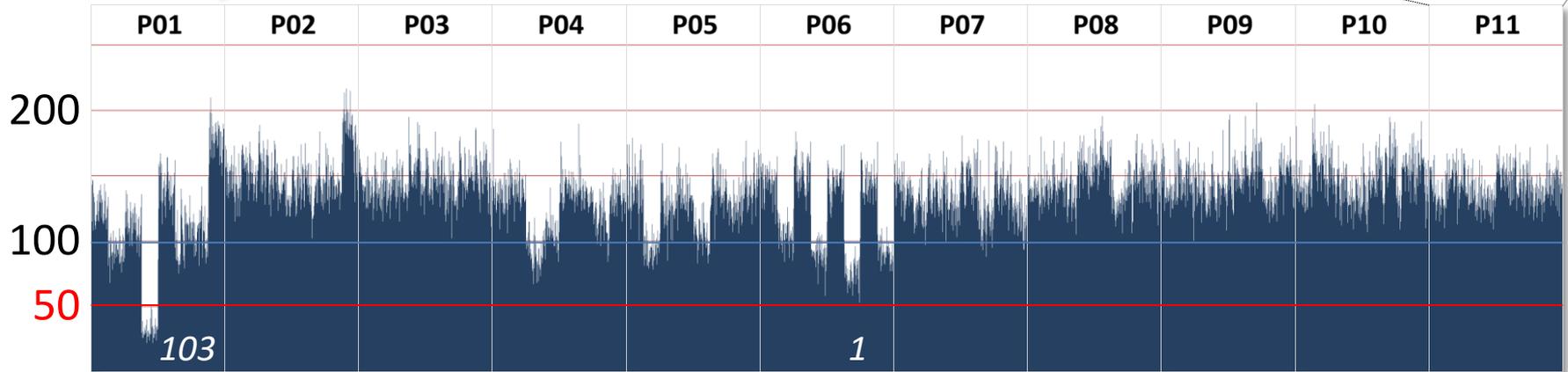
判ったこと

施設間差がある！

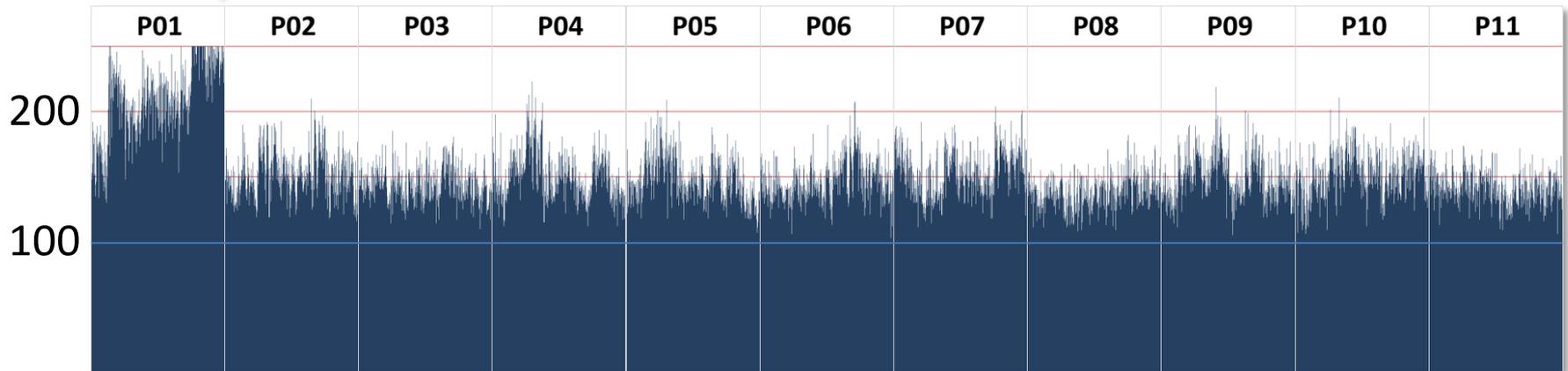
Beads count

K1 classI/II K2 I/II K3 I/II K4 I/II; 784 beads

Beads 2.5 μ L



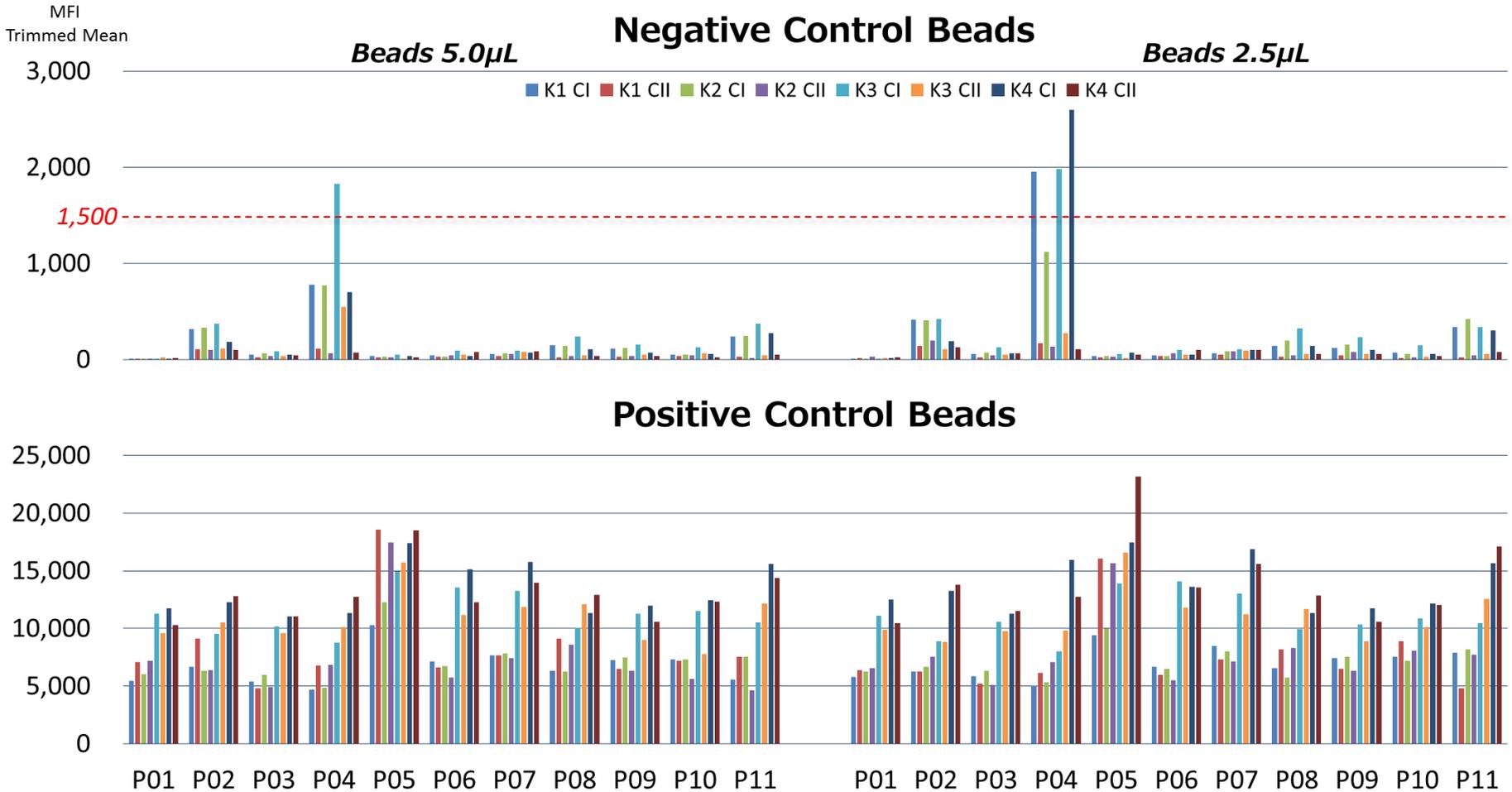
Beads 5.0 μ L



D. General Guidelines

Each bead count should be over 50. A lower bead count may be due to sample loss during the wash steps. It could also be due to improper calibration or clogging of the LABScan™ 100 or LABScan3D™ flow analyzer, or by photo-bleached beads that dropped out from the mapped region. (LS-LSCN-PI-EN-00, Rev 255)

Control Beads



D. General Guidelines

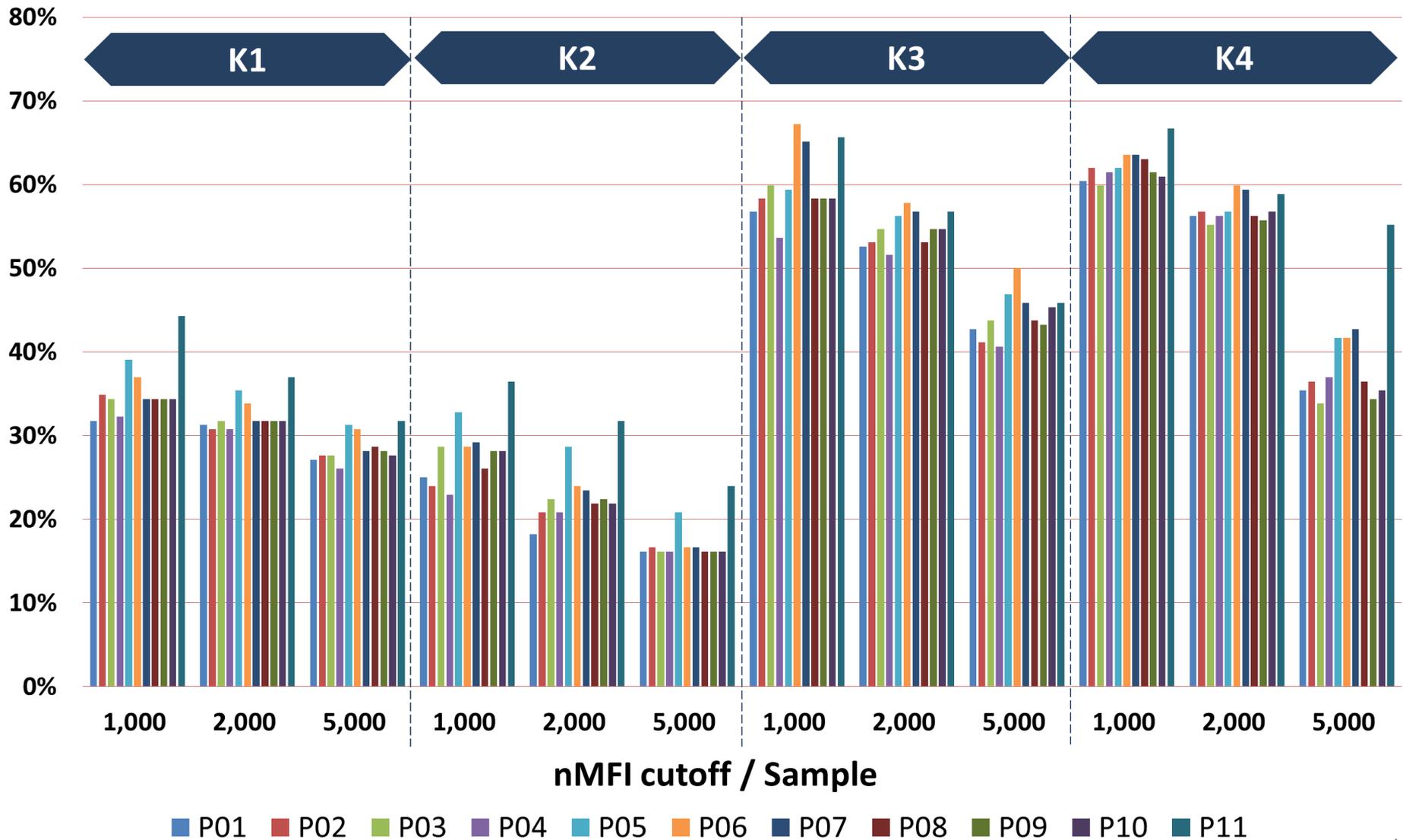
The NC value is usually less than 500 except for serum samples with a high background. **It should always be lower than 1500** and less than or equal to half of the PC value.

The PC value should be over 500 and at least twice the NC value.

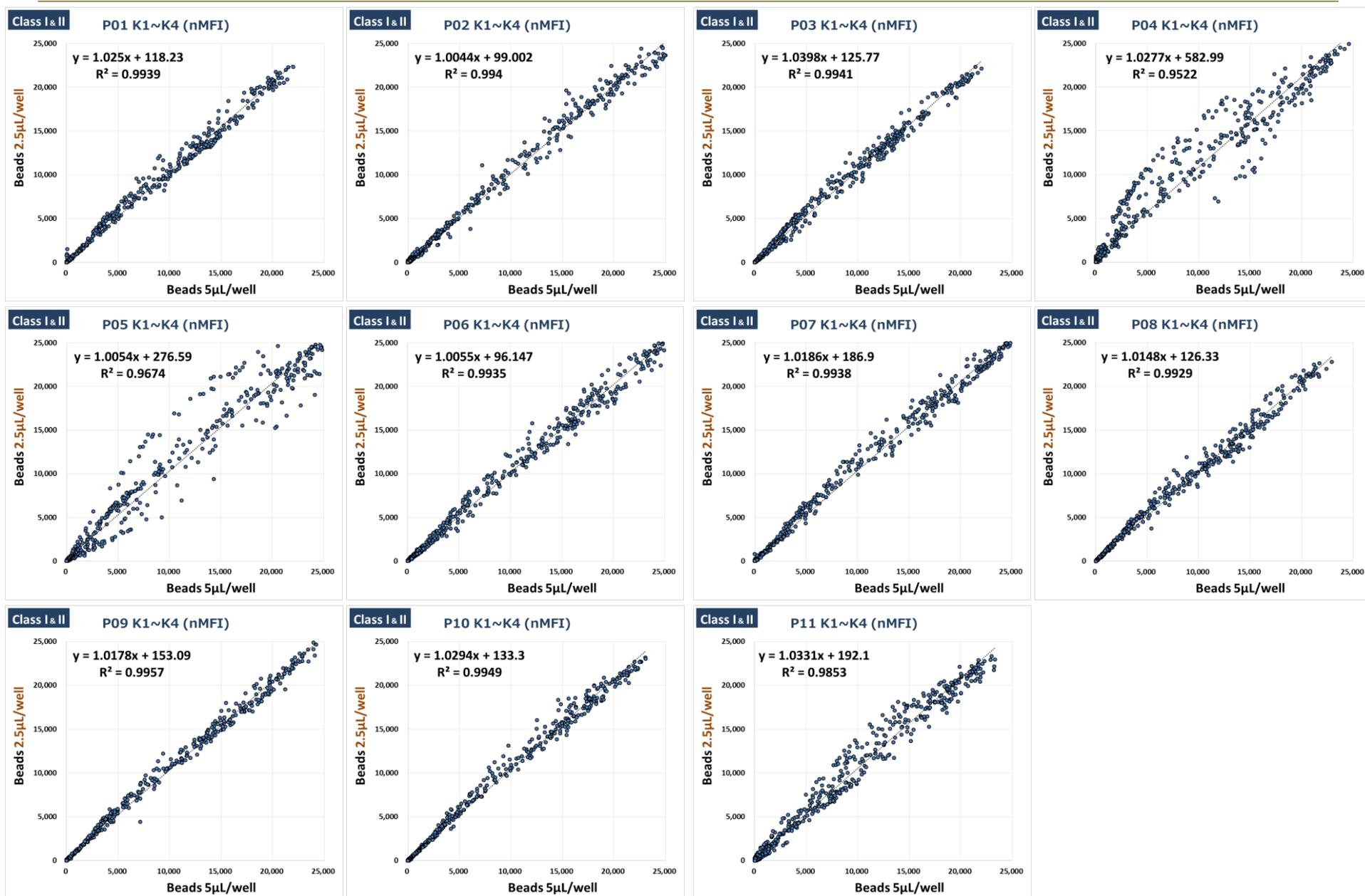
(LS-LSCN-PI-EN-00, Rev 255)

抗体陽性率：施設別

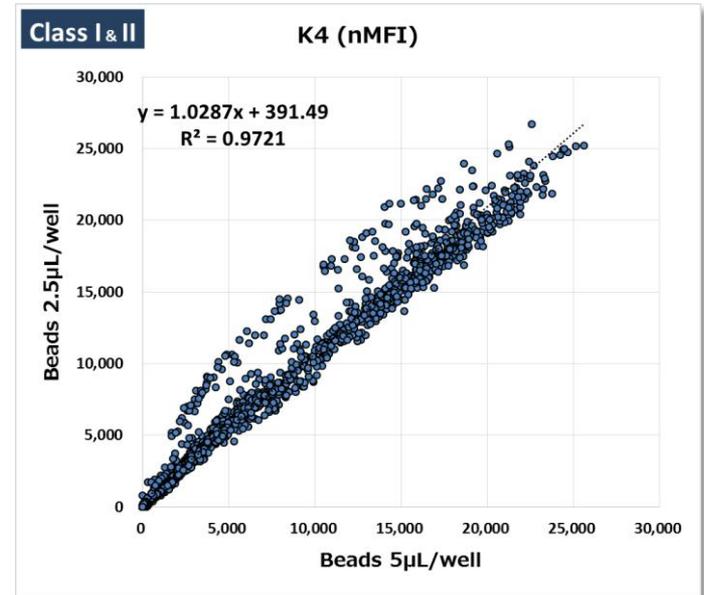
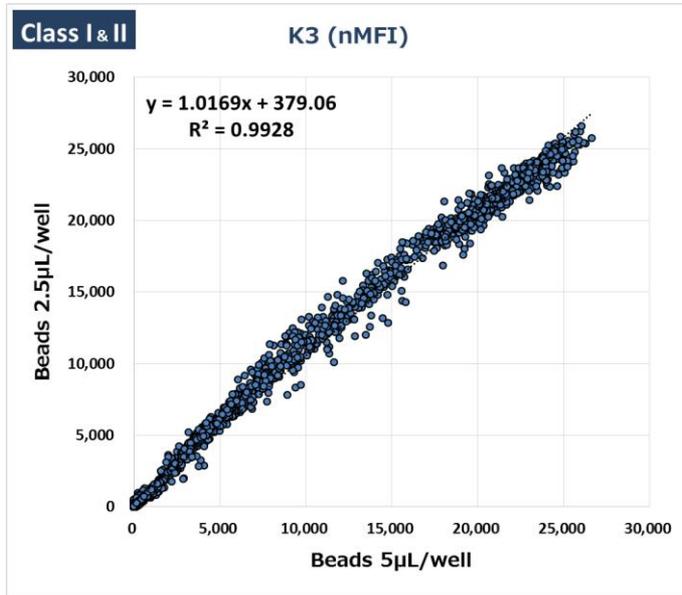
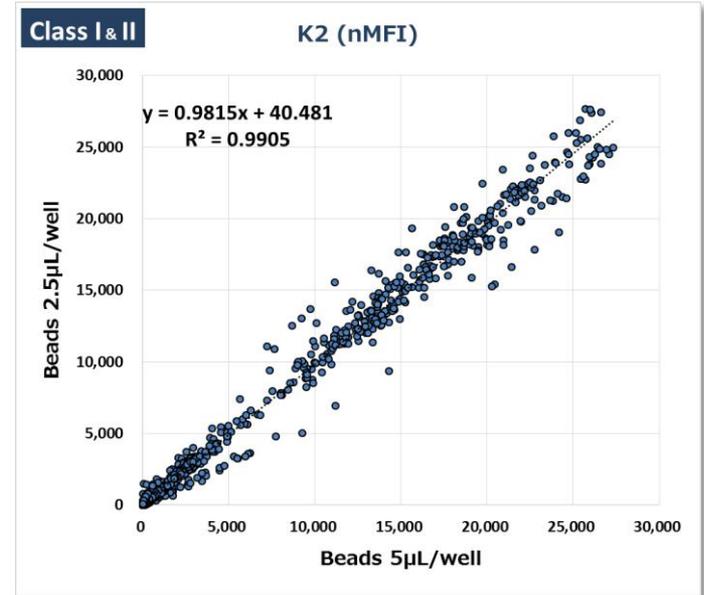
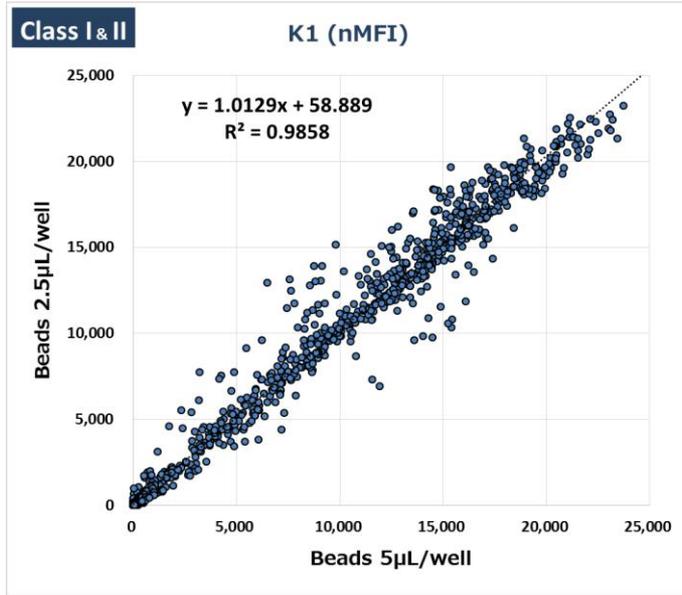
%PRA 抗体陽性率の違いは特異性判定の微妙な相違に直結する



Beads 2.5μL vs 5.0μL 相関: 施設別



Beads 2.5 μ L vs 5.0 μ L 相関: サンプル別



判ったこと

施設間差がある！

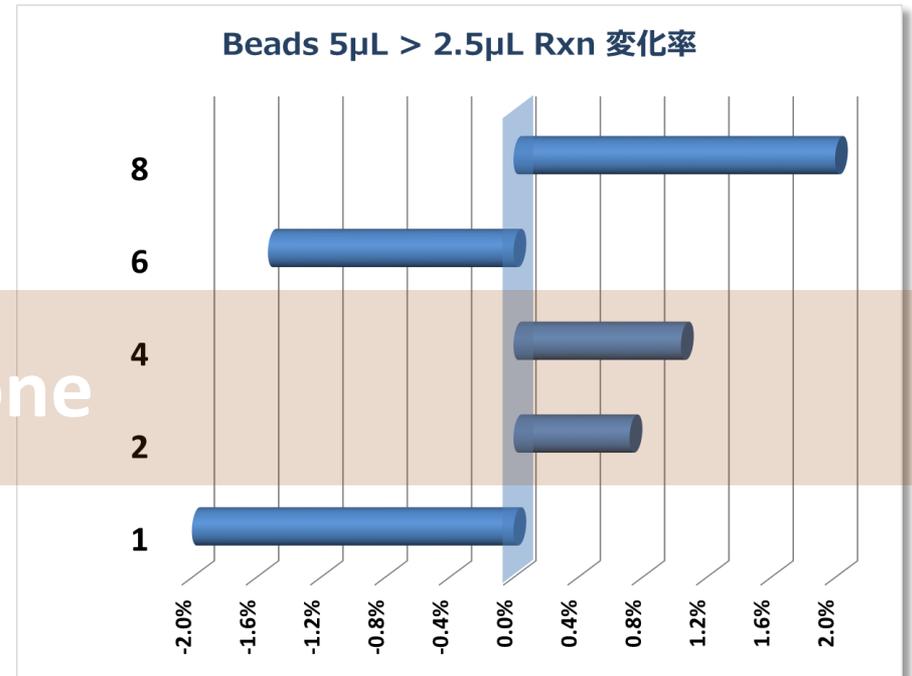
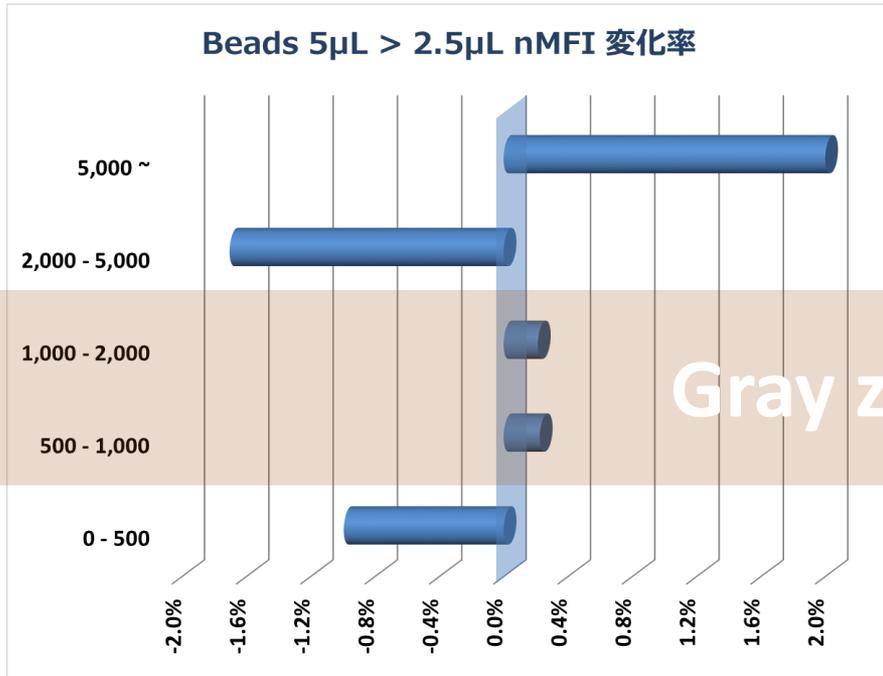
半量では測定値分布が陽性方向にシフトする！

弱陽性領域では測定値分布の変化率が逆転している！

測定値分布の変化率

変化率

各クラスター (nMFI=500-1,000など) 内の測定値分布が
ビーズ5 μ Lと2.5 μ Lでどのように変化したかを表す。
N=8,848 (K1~K4、Class I & II、11施設)



スコア (Rxn) は、前後のシグナル強度の関係とエピソード情報からソフトウェアが自動的に判定する

測定値分布の詳細

Beads ID	HLA Specificity	Bw4/6 DQA/DPA	Molecular Specificity	nMFI		Rxn	
				Beads 5.0 μ L	Beads 2.5 μ L	Beads 5.0 μ L	Beads 2.5 μ L
65	B51	Bw4	B*51:02	4,270	5,379	8	8
25	A36		A*36:01	4,483	5,576	8	8
71	B57	Bw4	B*57:01	4,659	5,750	8	8
59	B49	Bw4	B*49:01	4,199	5,161	6	8
51	B39	Bw6	B*39:01	4,958	5,877	8	8
50	B38	Bw4	B*38:01	4,716	5,633	8	8
72	B57	Bw4	B*57:03	4,664	5,544	8	8
73	B58	Bw4	B*58:01	4,190	5,023	6	8
40	B75	Bw6	B*15:02	4,337	5,097	8	8
8	A11		A*11:01	4,485	5,134	8	8
36	B13	Bw4	B*13:02	4,665	5,299	8	8
96	B13	Bw4	B*13:01	1,858	2,304	6	6
12	A24		A*24:03	1,871	2,285	6	6
96	DP28	DPA1*04:01	DPB1*28:01	1,769	2,169	6	6
64	DQ9	DQA1*02:01	DQB1*03:03	1,992	2,138	6	6
35	B8	Bw6	B*08:01	959	1,084	4	4
38	DR51		DRB5*02:02	958	1,047	6	4
90	DP18	DPA1*01:05	DPB1*18:01	378	526	4	4
49	DQ5	DQA1*01:02	DQB1*05:02	474	510	4	4

測定値分布の逆転は、各クラスター (nMFI=500-1,000 など) の設定が原因!

2000~5000
 5000~

1000~2000
 2000~5000

500~1000
 1000~2000

0~500
 500~1000

判ったこと

施設間差がある！

半量では測定値分布が陽性方向にシフトする！

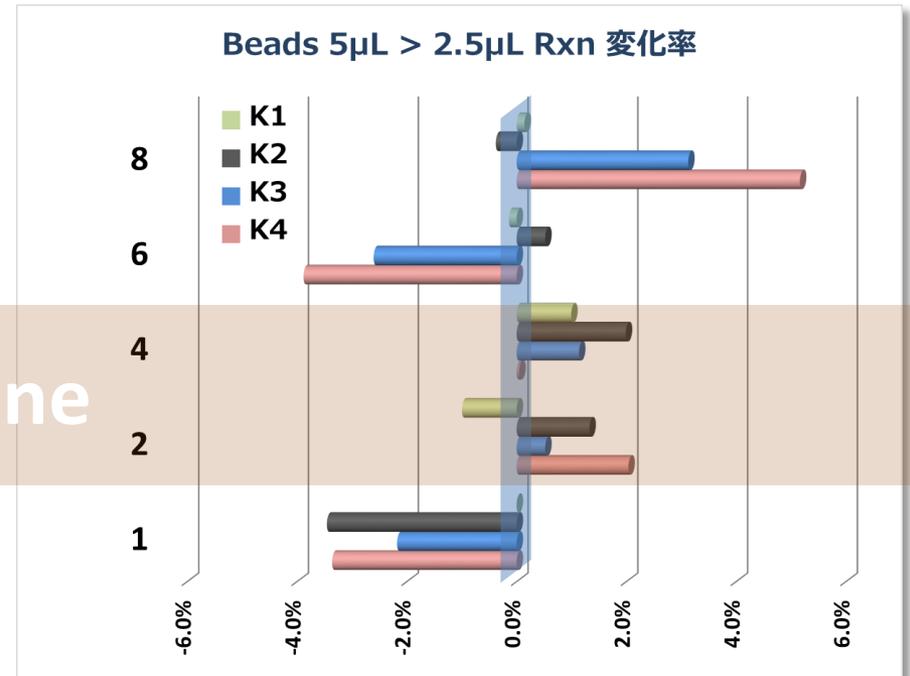
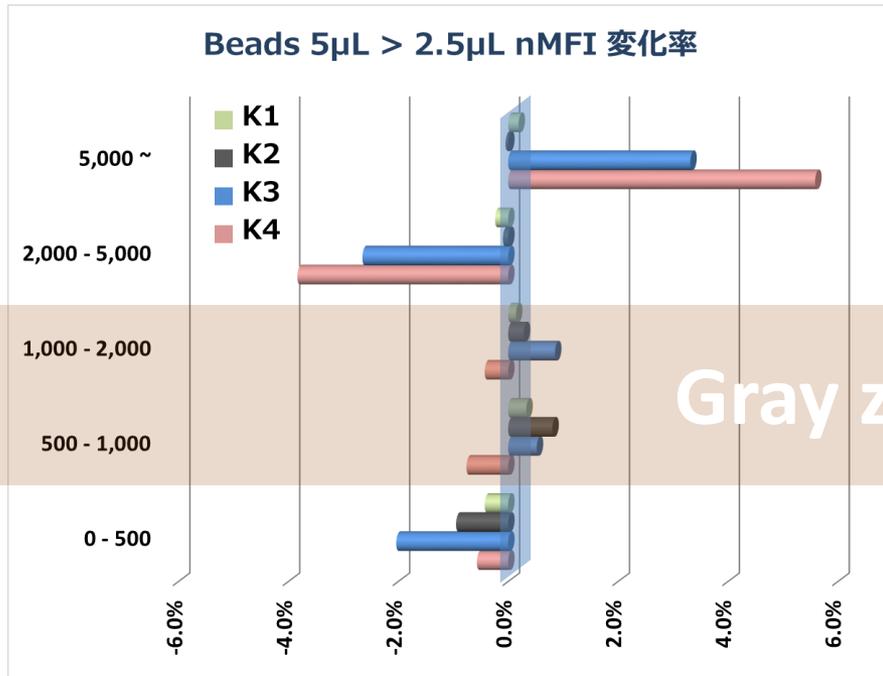
弱陽性領域では測定値分布の変化率が逆転している！

%PRAが高いサンプルは測定値分布の変化率が大きい！

測定値分布の変化率：サンプル別

変化率

各クラスター（nMFI=500-1,000など）内の測定値分布が
ビーズ5 μ Lと2.5 μ Lでどのように変化したかを表す。
N=8,848（K1~K4、Class I & II、11施設）



%PRA nMFI ≥ 5,000

K1	28.6%
K2	17.4%
K3	44.5%
K4	39.1%

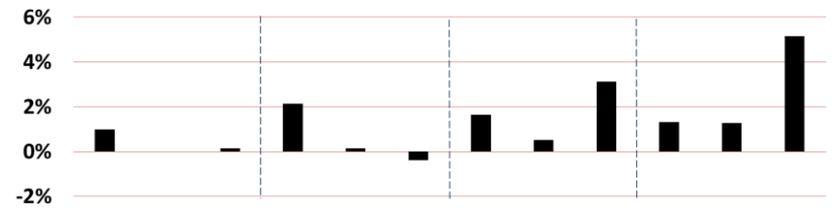
スコア (Rxn) は、前後のシグナル強度の関係とエピソード情報からソフトウェアが自動的に判定する

Beads 2.5 μ L vs 5.0 μ L 抗体陽性率：サンプル別

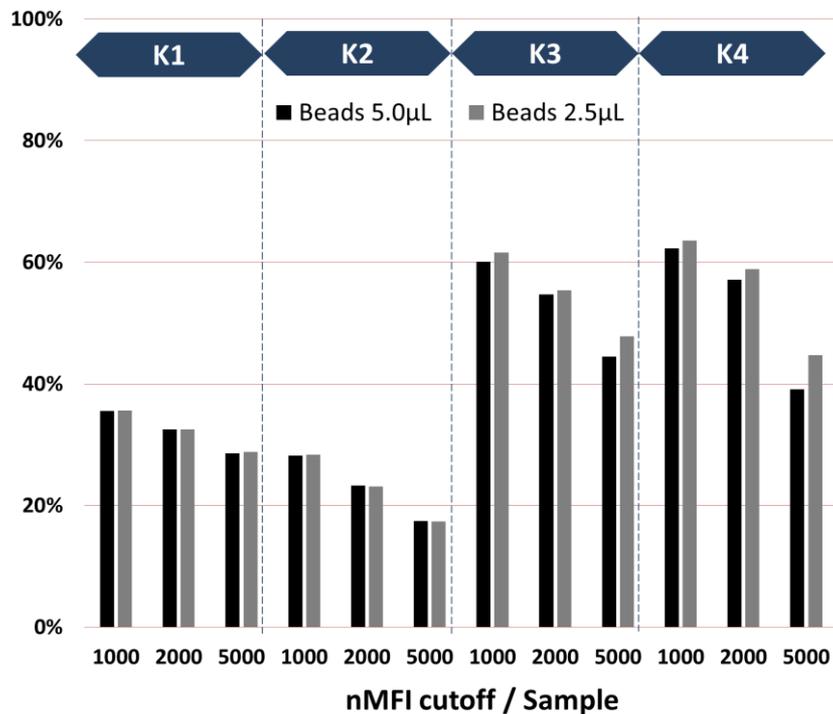
変化率の差



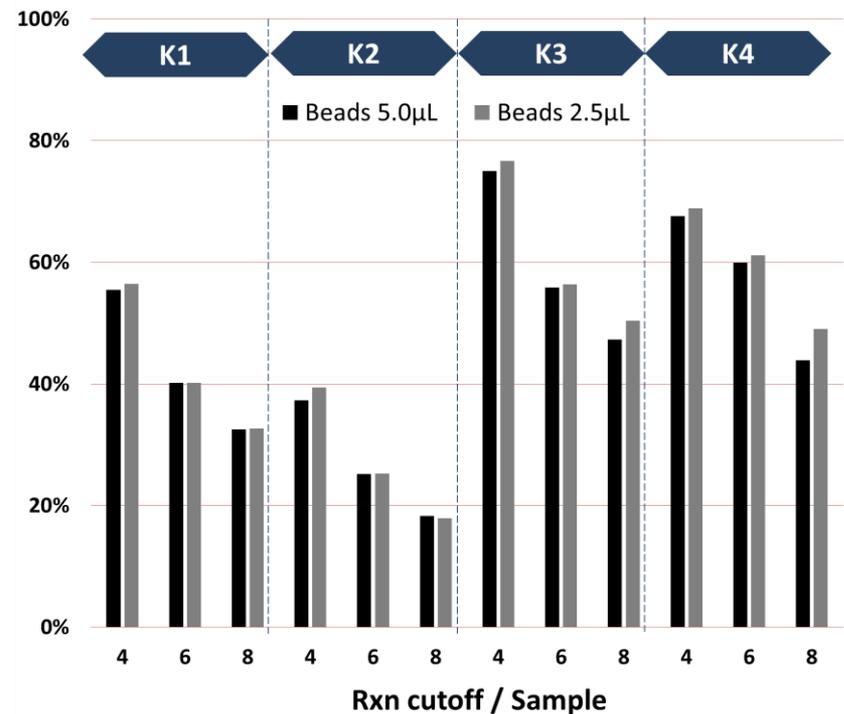
変化率の差



%PRA



%PRA



判ったこと

施設間差がある！

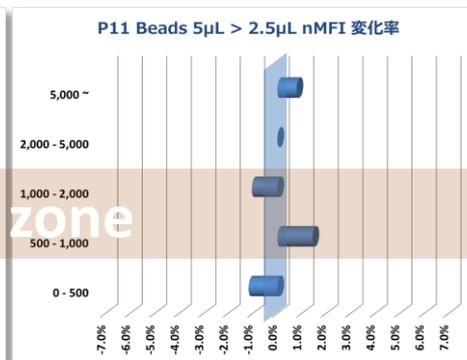
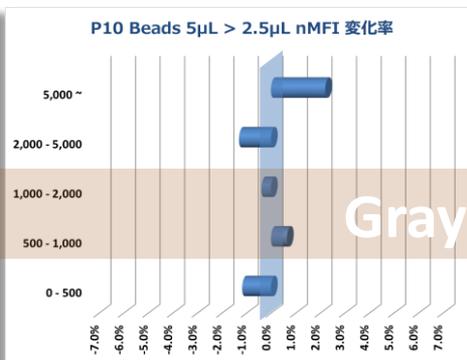
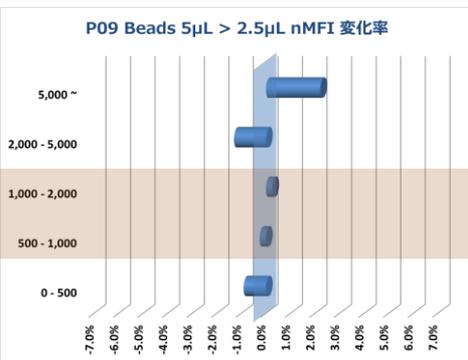
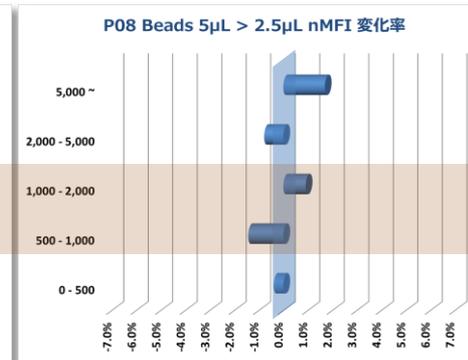
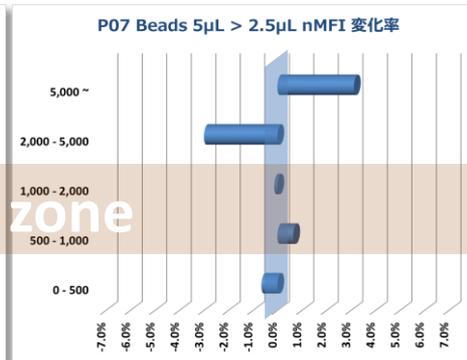
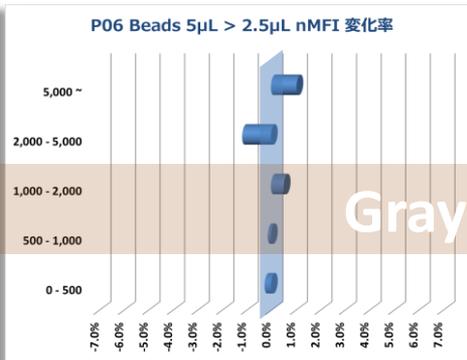
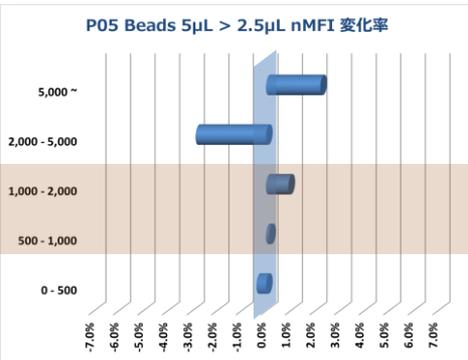
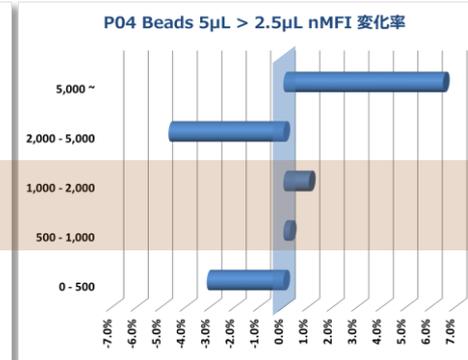
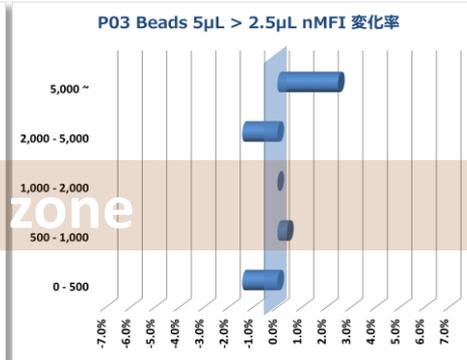
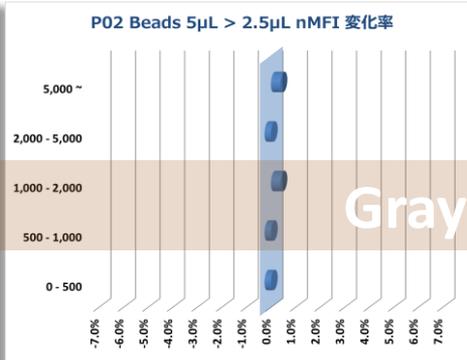
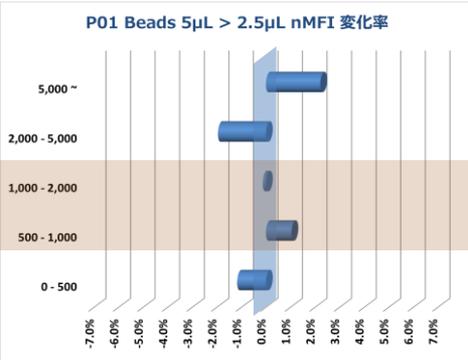
半量では測定値分布が陽性方向にシフトする！

弱陽性領域では測定値分布の変化率が逆転している！

%PRAが高いサンプルは測定値分布の変化率が大きい！

測定値分布の変化は特異性判定に影響する可能性がある！

測定値分布の変化率：施設別



測定値分布の詳細

Beads ID	HLA Specificity	Bw4/6 DQA/DPA	Molecular Specificity	nMFI		Rxn	
				Beads 5.0 μ L	Beads 2.5 μ L	Beads 5.0 μ L	Beads 2.5 μ L
65	B51	Bw4	B*51:02	4,270	5,379	8	8
25	A36		A*36:01	4,483	5,576	8	8
71	B57	Bw4	B*57:01	4,659	5,750	8	8
59	B49	Bw4	B*49:01	4,199	5,161	6	8
51	B39	Bw6	B*39:01	4,958	5,877	8	8
50	B38	Bw4	B*38:01	4,716	5,633	8	8
72	B57	Bw4	B*57:03	4,664	5,544	8	8
73	B58	Bw4	B*58:01	4,190	5,023	6	8
40	B75	Bw6	B*15:02	4,337	5,097	8	8
8	A11		A*11:01	4,485	5,134	8	8
36	B13	Bw4	B*13:02	4,665	5,299	8	8
96	B13	Bw4	B*13:01	1,858	2,304	6	6
12	A24		A*24:03	1,871	2,285	6	6
96	DP28	DPA1*04:01	DPB1*28:01	1,769	2,169	6	6
64	DQ9	DQA1*02:01	DQB1*03:03	1,992	2,138	6	6
35	B8	Bw6	B*08:01	959	1,084	4	4
38	DR51		DRB5*02:02	958	1,047	6	4
90	DP18	DPA1*01:05	DPB1*18:01	378	526	4	4
49	DQ5	DQA1*01:02	DQB1*05:02	474	510	4	4

測定値分布の変化は、
特異性判定に影響する
可能性がある！

2000~5000
➡ 5000~

1000~2000
➡ 2000~5000

500~1000
➡ 1000~2000

0~500
➡ 500~1000

判ったこと

施設間差がある！

半量では測定値分布が陽性方向にシフトする！

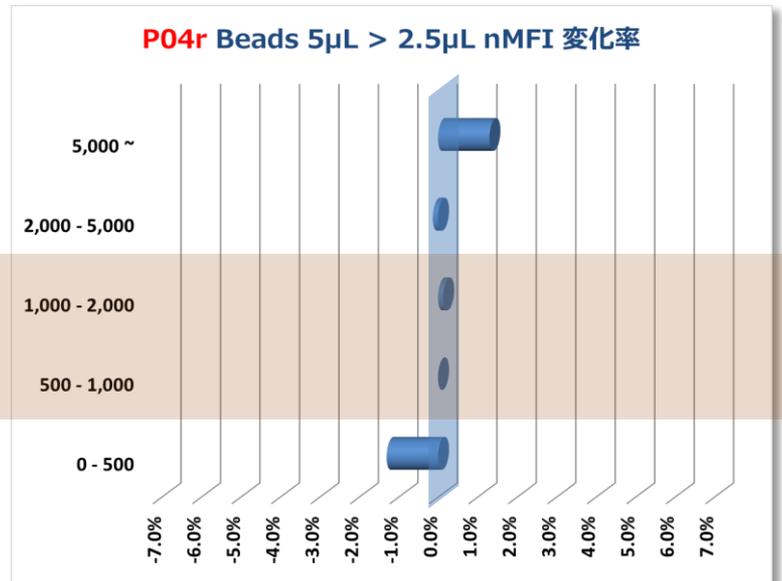
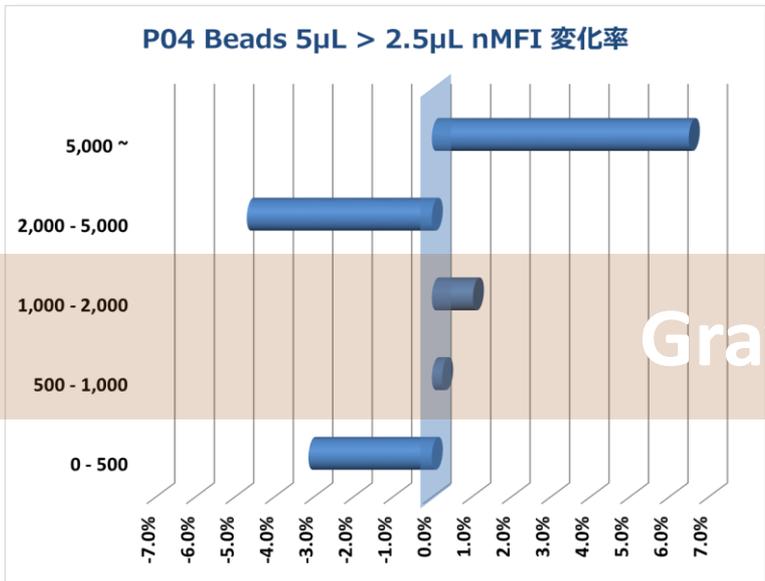
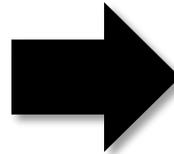
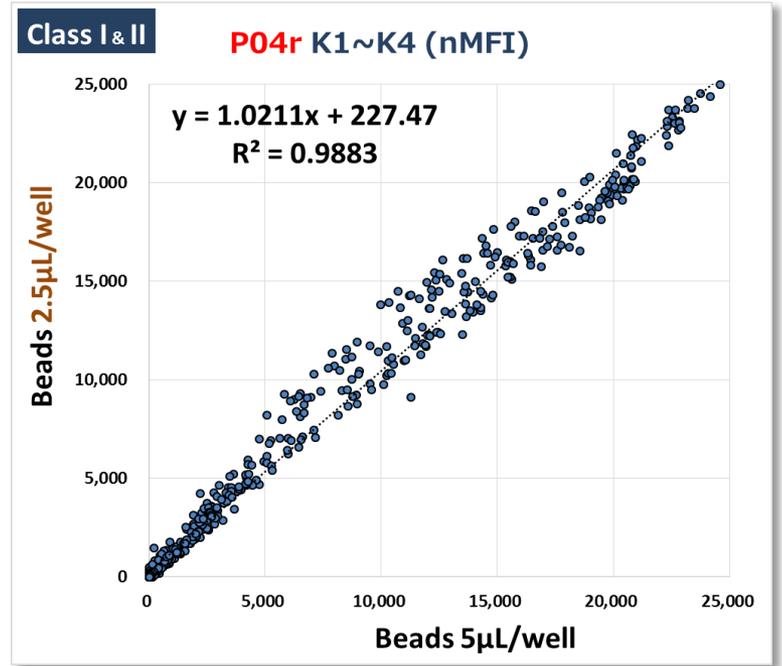
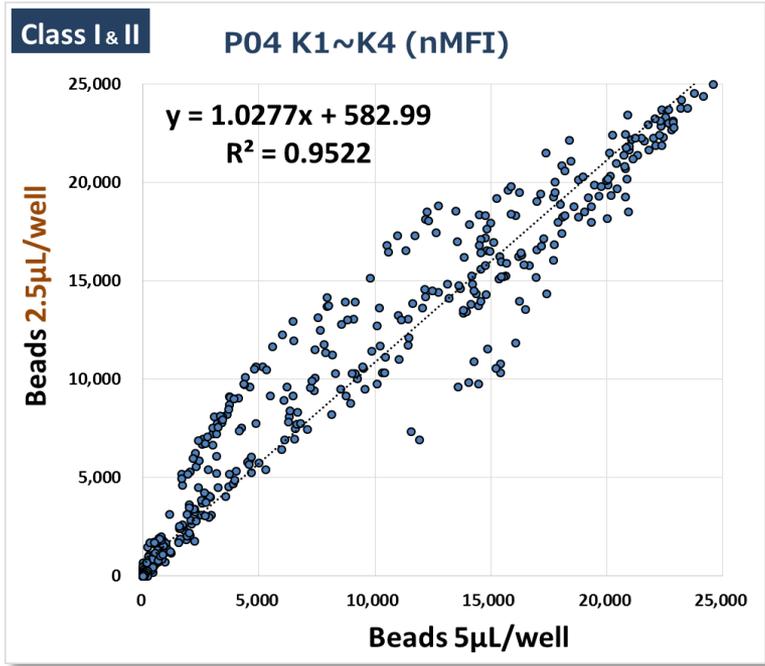
弱陽性領域では測定値分布の変化率が逆転している！

%PRAが高いサンプルは測定値分布の変化率が大きい！

測定値分布の変化は特異性判定に影響する可能性がある！

バックグラウンドの処理でデータが改善される！

非特異反応吸着処理で改善



気になったこと

施設間差がある！

半量では測定値分布が陽性方向にシフトする！

弱陽性領域では測定値分布の変化率が逆転している！

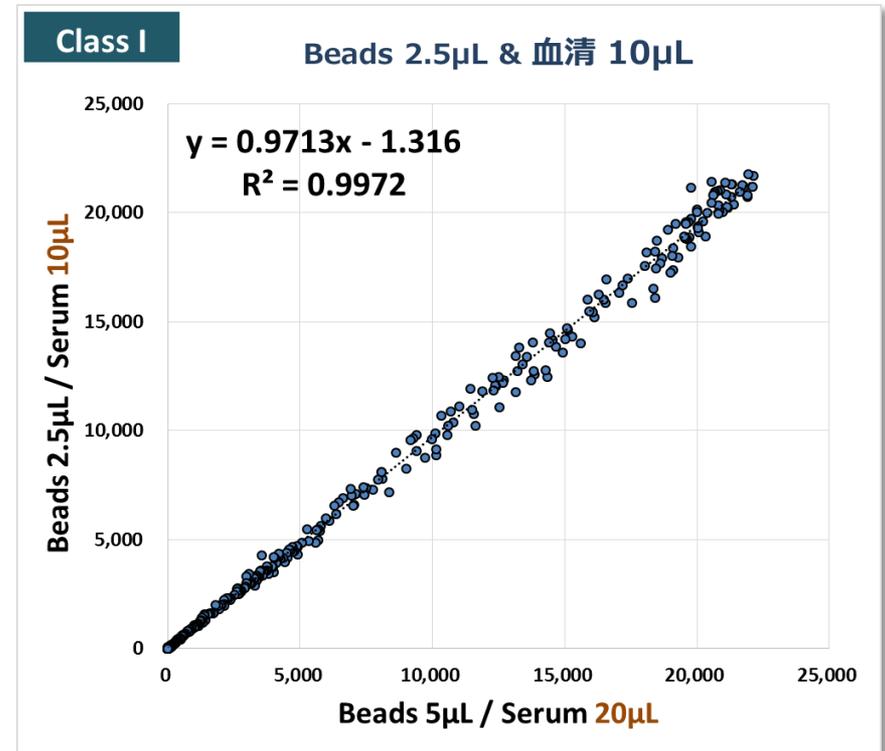
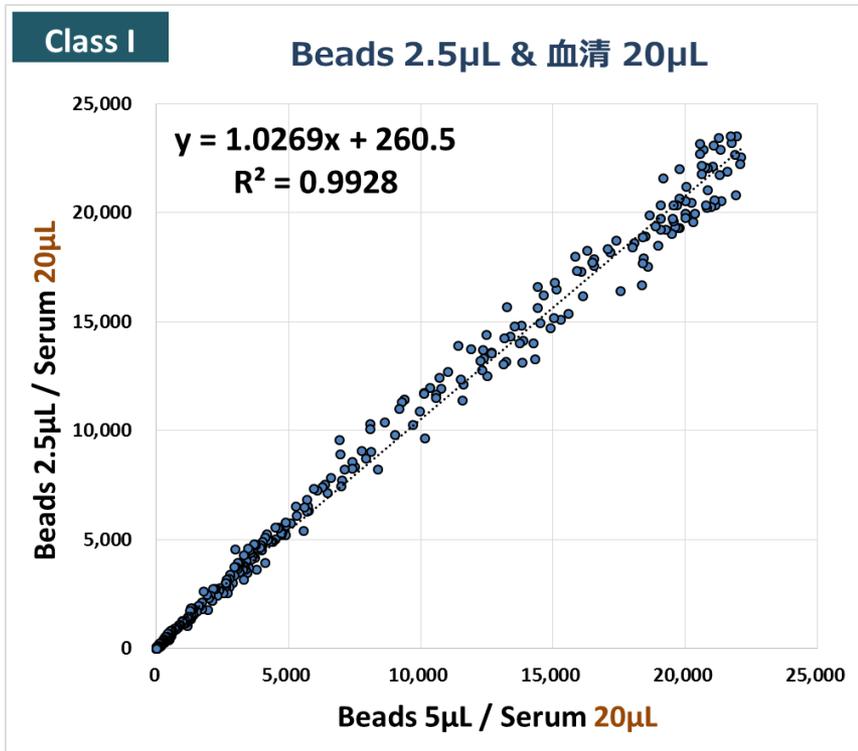
%PRAが高いサンプルは測定値分布の変化率が大きい！

測定値分布の変化は特異性判定に影響する可能性がある！

バックグラウンドの処理でデータが改善される！

操作の正確性を欠くと半量法での試薬性能を低下させる！

気になったこと → 追加試験



Beads	Serum	Dil.
5.0 μ L	20 μ L	x1.25
2.5 μ L	20 μ L	x1.125
2.5 μ L	10 μ L	x1.25

※血清濃度が若干高い状態のため
陽性傾向となっていたか？

※血清濃度を揃えたら陰性傾向に
なった！

結 語

施設間差がある！

半量では測定値分布が陽性方向にシフトする！

弱陽性領域では測定値分布の変化率が逆転している！

%PRAが高いサンプルは測定値分布の変化率が大きい！

測定値分布の変化は特異性判定に影響する可能性がある！

バックグラウンドの処理でデータが改善される！

操作の正確性を欠くと半量法での試薬性能を低下させる！

適正な血清量は更に検討が必要！