# 第3回関東HLA研究会学術集会

# 【ワークショップ】

# 蛍光ビーズ法を用いた 補体結合性抗体の検出ワークショップ

# 中島文明 日本赤十字社 中央血液研究所 研究開発部

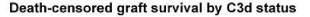
2019年5月18日(土) 東海大学高輪キャンパス2号館1階

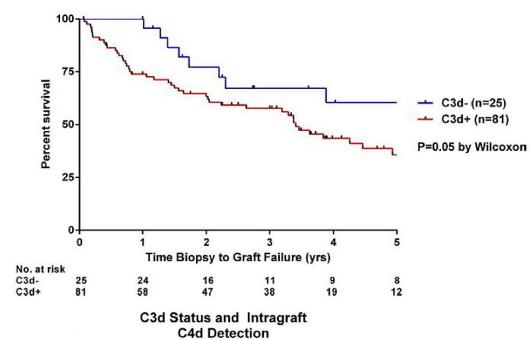
# 関東HLA研究会 COI 開示

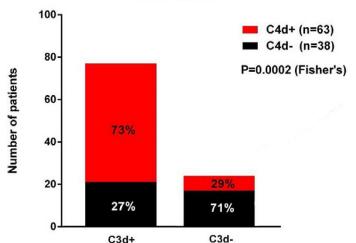
筆頭発表者名:中島文明

演題発表に関連し、発表者らに開示すべき COI 関係にある企業などはありません。

# 臓器移植と補体結合性HLA抗体







腎臓移植患者106症例の5年経 過観察中に循環機能不全時の 81例(76.4%)がC3d+DSAで あった。

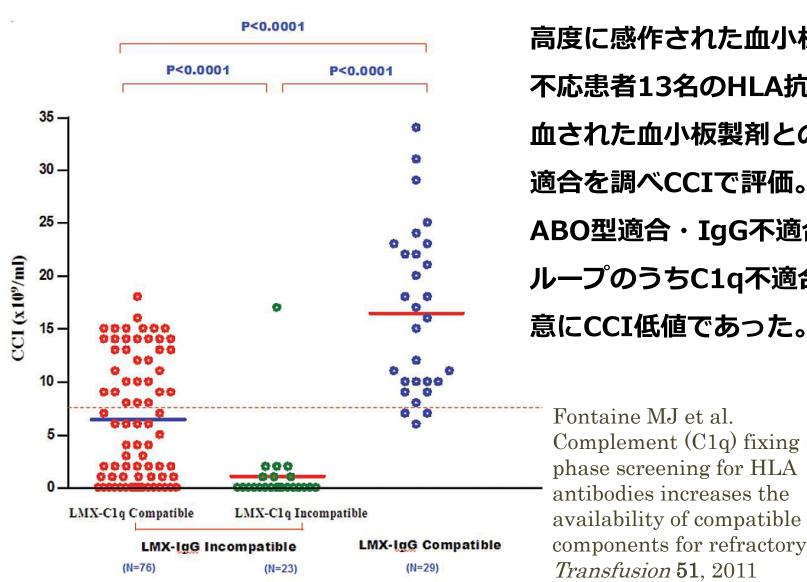
また、C3d+DSA群は、腎生 検で73%がC4d+であった。 一方、C3d-C4d-群は76%が Single DSAであった。

Lan JH et al.

Clinical utility of complementdependent C3d assay in kidney recipients presenting with late allograft dysfunction.

Am J Transplant 18, 2018

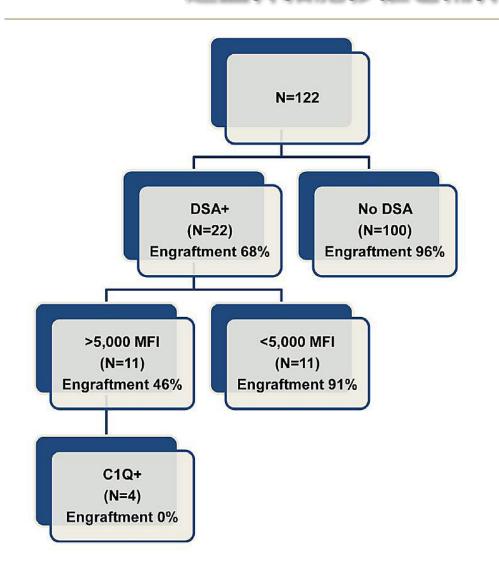
# 血小板輸血と補体結合性HLA抗体



高度に感作された血小板輸血 不応患者13名のHLA抗体と輸 血された血小板製剤とのHLA 適合を調べCCIで評価。 ABO型適合・IgG不適合グ ループのうちC1q不適合が有

Fontaine MJ et al Complement (C1q) fixing solidphase screening for HLA antibodies increases the availability of compatible platelet components for refractory patients. *Transfusion* **51**, 2011

# 造血幹細胞移植と補体結合性HLA抗体



122症例のハプロ移植におい て、22例がDSAを保有して おり, その中でMFI>5,000 かつC1q陽性の4例は,すべ て生着不全となった。高い MFI値とC1q拘束力がある補 体結合DSAは, 著しく生着率 の低下を招くことを示した。

Ciurea SO et al. Complement-Binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Risk of Primary Graft Failure in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 21, 2015

# はじめに

蛍光ビーズ法を用いたHLA抗体の測定では、抗ヒトIgGの蛍光値(nMFI)を指標に判定評価され、 臨床医にとって数値で示すことは利便性が高いと受け入れられてきた。移植・輸血医療における臨床 評価との比較検討を重ねてきた結果、どの分野においても適正なカットオフがなかなか定まらず混迷 している。このような状況で、nMFI値のみで評価する手法に留まらず、プロゾーン回避のための抗体 希釈系列による検討、イムノグロブリン・サブクラスによる検討、HLA抗原発現量の差異、**補体結合性** 抗体による検討など臨床成績に近づけるための様々な検証がされている。特に、補体結合性DSAの 回避は、移植・輸血医療において**有効性が高い**という論文が数多く公表されている。しかしながら、 日本組織適合性学会が主催するQCワークショップでは、補体結合性抗体の検査結果は皆無という 状況で、**日本国内ではこの手法が浸透していない**と考えられる。

今後、この検査が潮流となる可能性もあることから、補体結合性抗体の検出ワークショップを企画し実施した。まずは、抗ヒトIgGとの**結果の違いを体験**してもらい、同時に複数施設の参加で**施設間差**を確認した。この手法を取り入れてデータを蓄積していくことが今後の臨床評価につながると期待する。

# 方法・試薬

- 1. 以下の試薬セットのいずれか、或いは双方を参加施設で準備する
- 2. Single試薬を日常的に使用している場合は、C1q、C3dキットを追加するだけ
- 3. 配布抗血清(4検体)について抗ヒトIgGによる検出と補体結合性抗体の検出をする

HLA Fusion®

IMMUCOF

4. Luminex測定データ(output.csv)を中央血液研究所に提出

#### 《One Lambda》

LABScreen C1q Screen (25tests #PEC1Q)

LABScreen Single Antigen HLA Class I - Combi (25tests #LS1A04)

PE-Conjugated Goat Anti-Human IgG (1000tests #LS-AB2)

【オプション】C1q Screen Positive Control Class I (20tests # C1Q-PC1) <sup>(2)</sup>

Software: HLA Fusion Software Version 4.3 (One Lambda)

#### **《LIFECODES》**

LIFECODES C3d Detection (24tests # 265400R) 品番TP-1801

LIFECODES LSA Class I Kit (24tests # 265100R) 品番TP-1005 A Class I Kit (24tests # 265100R) A Class I

Software: MATCH IT! ANTIBODY Version 1.3 (LIFECODES)

# サンプル

# ◆サンプル

# HLA抗血清 (Blood donor) K1~K4で表示

Serum ID	LCT specificity	ABO Rh	Sex Age	collection date
<b>K1</b>	A24+B7+B48w+B60w	A+	F32	1992/12/27
K2	A2+A28	B+	F62	1994/06/04
К3	Cw9+Cw10	A+	F32	2001/05/15
K4	A26+Cw7	Α?	??	?/?/?

<sup>※ 2019</sup>年1月29日: サンプル血清を9施設に0.5mLずつ配布

# 参加状況

# 参加施設:9施設 P01~P09で表示

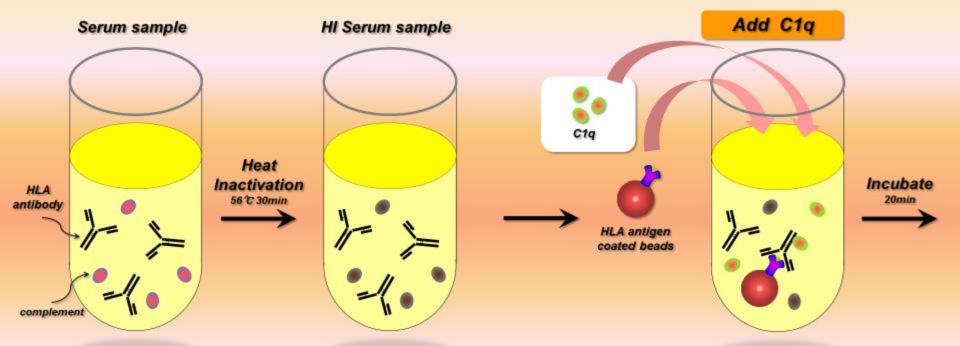
Lab. code	One Lambda		LIFECODES			
	Beads Lot.	Control serum		Dondo Lat	Control serum	
		IgG	C1q	Beads Lot.	IgG	C3d
P01	011	NC	NC PC			
P02	011	-	NC PC			
P03	011	-	NC PC	3007543	NC	NC
P04				3007543	NC PC	NC PC
P05				3007543	NC PC	NC PC
P06				3007543	NC PC	NC PC
P07	010	-	NC PC			
P08				3007441	NC PC	NC PC
P09	011		NC PC	3007441	NC	NC
Total	5	Labs		E	5 Labs	

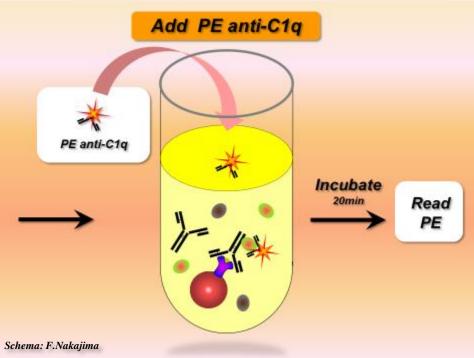
<sup>※</sup> OneLambda IgG はソフトウェア既定のNC値を参照して解析、C1qは添付のNCを使用して解析

<sup>※</sup> LIFECODESは、IgG, C3dともにLSA添付のNCを使用して解析

# protocols

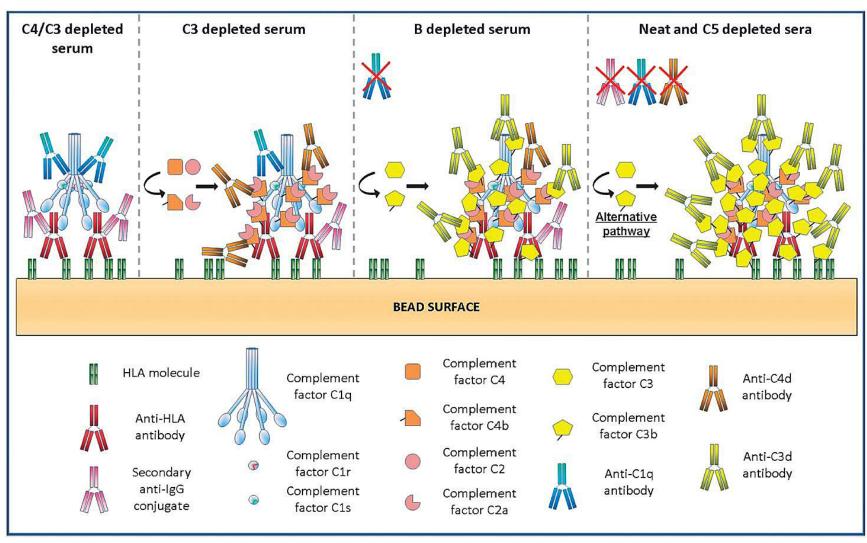
One Lambda		<b>LIFECODES</b>	
C1qScreen		C3d Detection	
96 wel microplate		96 wel filterplate	
20μL	← Serum volume	10μL	
56℃ / 30min	Heat denaturation	-	
8,000-10,000g / 10min	← Serum centrifuge	10,000g / 30sec	
1µL	← Complement volume	-	
C1q:HEPES = 1:4	HEPES treatment	-	
5μL	SAB volume	40μL	
0.5μL	Positive control bead	1μL	
r.t / 20min / on shaker	Primary reaction →	r.t / 30min / on shaker	
-	Complement volume →	30μL	
-	Complement reaction	r.t / 30min / on shaker	
-	Wash →	add 100µL* & aspirate	
-	Washes	4 x add 250µL* & aspirate	
<b>20μL</b>	Conjugate	50μL	
r.t / 20min / on shaker	Secondary reaction	r.t / 30min / on shaker	
add 80µL† & 1,300g / 5min	Wash	add 100µL* & aspirate	
-	Wash	add 250µL* & aspirate	
add 80µL†	Final suspension volume	add 200µL*	
( † pH7.4 PBS)		(* LSA wash buffer)	
90 min	Total time	110min	







# ビーズ上の補体結合反応



Visentin J et al.

Deciphering Complement Interference in Anti-Human Leukocyte Antigen Antibody Detection With Flow Beads Assays. *Transplantation* **98**, 2014

# 解析

◆IgG性抗体と補体結合性抗体の反応様態の違い

◆複数施設参加による施設間差の確認

- **※ LABScreen C1q Screen、LIFECODES C3d Detectionは直接比較しない**
- **※ One Lambda×C3d、LIFECODES×C1qの測定データは解析しない**

記号など K1~K4: サンプル抗血清、P01~P09: 参加施設コード

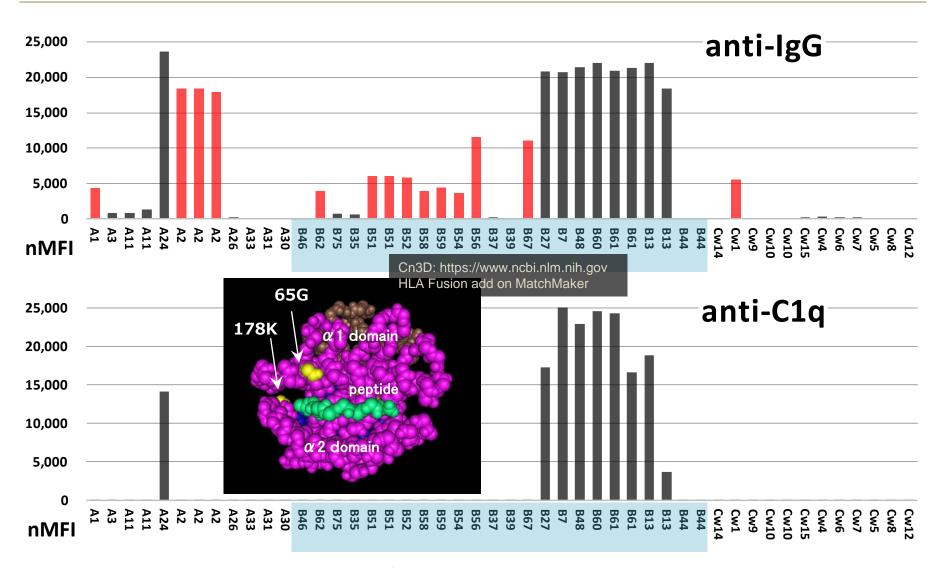
One Lambda: LABScreen C1q Screen

LIFECODES: LIFECODES C3d Detection

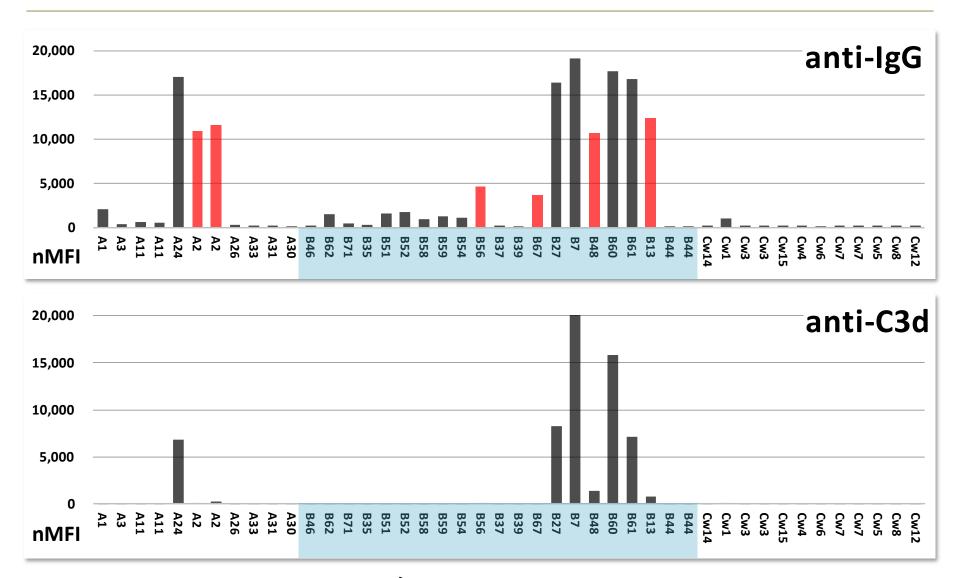
# 解析

◆IgG性抗体と補体結合性抗体の反応様態の違い

◆複数施設参加による施設間差の確認



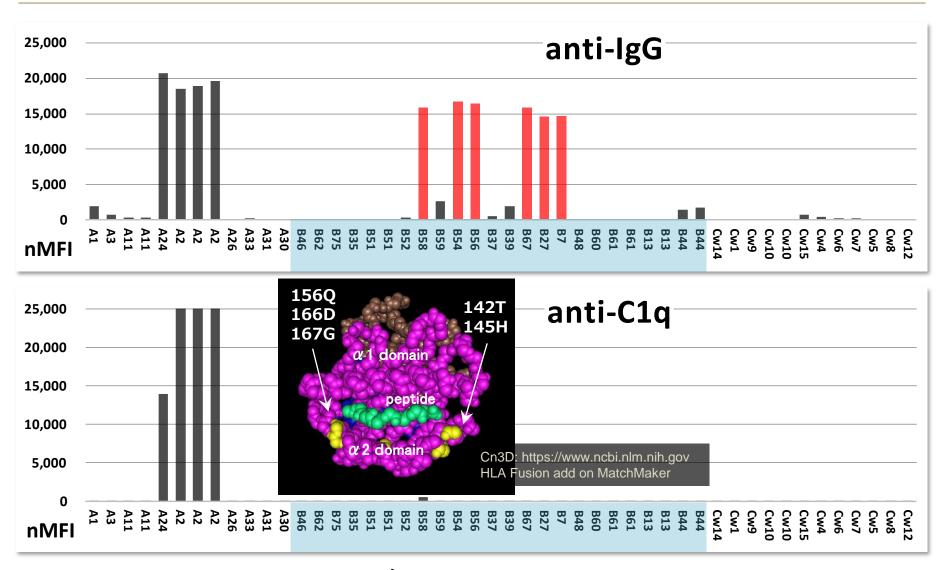
■ Anti-IgG≥3,000 anti-C1q<500



■ Anti-IgG≥3,000 anti-C3d<500

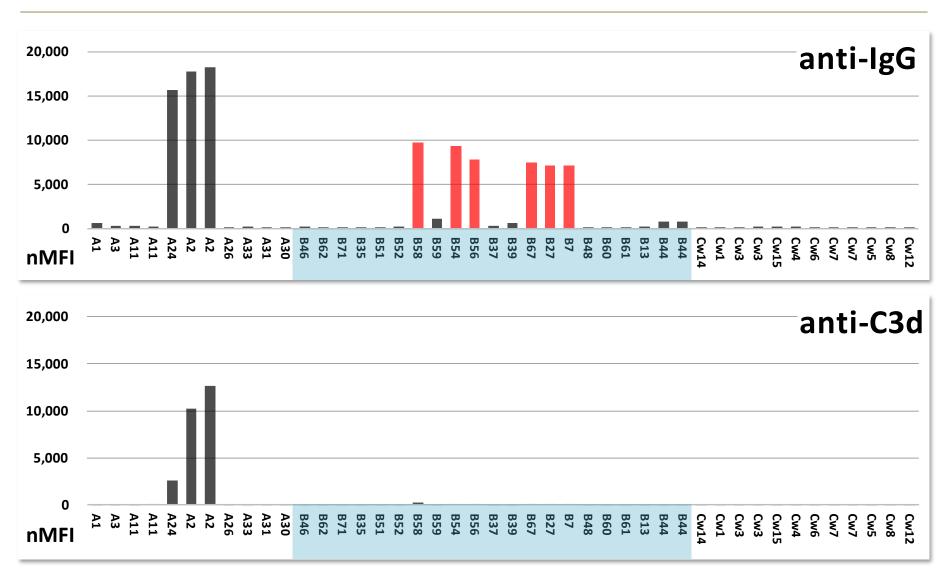
#### One Lambda

# **K2** A2+A28 (LCT)



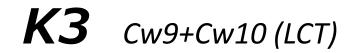
■ Anti-IgG ≥ 3,000 anti-C1q < 500</p>

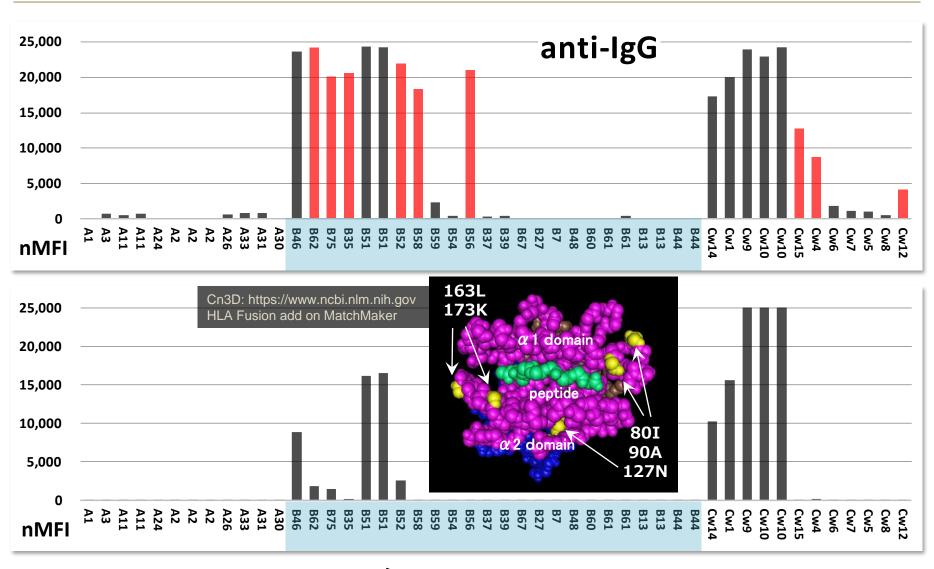
**K2** A2+A28 (LCT)



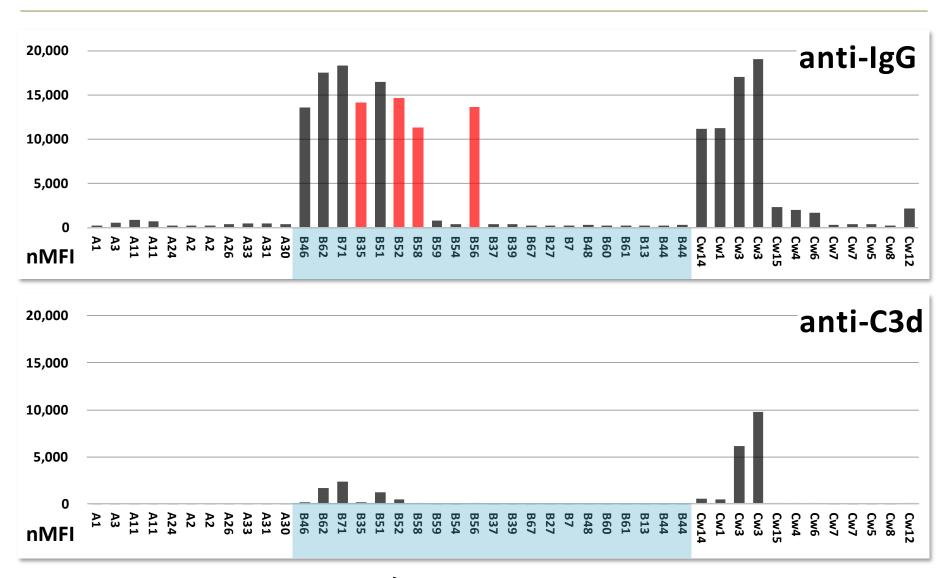
■ Anti-IgG ≥ 3,000 anti-C3d < 500</p>

#### One Lambda

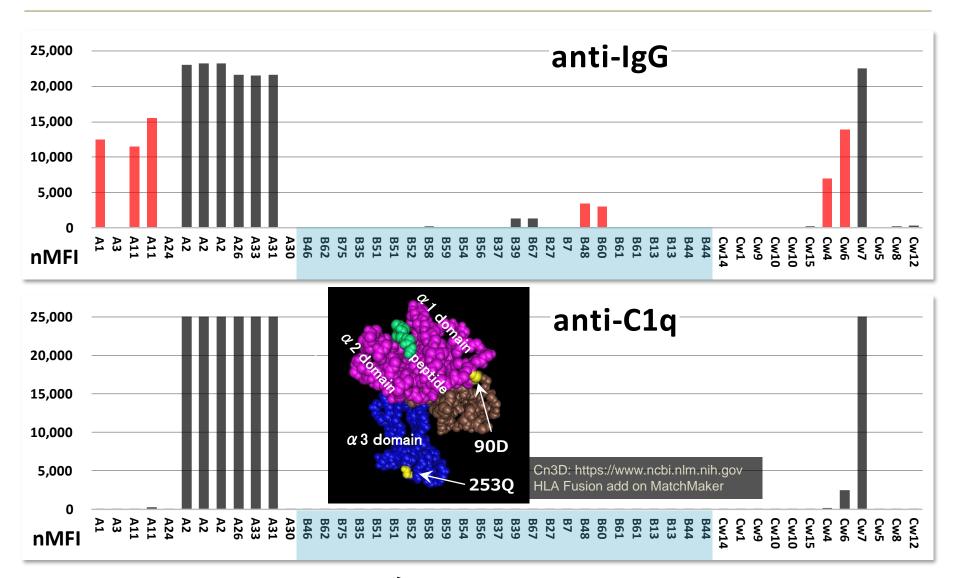




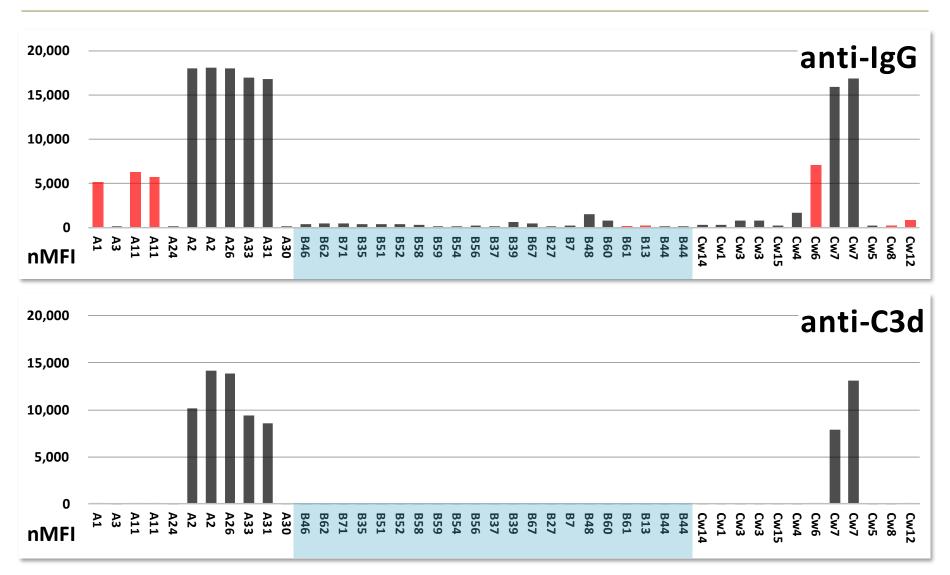
■ Anti-IgG≥3,000 anti-C1q<500



■ Anti-IgG ≥ 3,000 anti-C3d < 500</p>



■ Anti-IgG≧3,000 anti-C1q<500



■ Anti-IgG ≥ 3,000 anti-C3d < 500</p>

# 解析結果

◆IgG性抗体と補体結合性抗体の反応様態の違い IgG性抗体

反応強度が広範で不定=エピトープが定まらない 補体結合性抗体

明確な特異性=臨床的に意義のあるエピトープの決定(が期待される!)

- ※エピトープの決定
  - ・ DSA、許容抗原が確実に決定できる
  - ・ ビーズ試薬に含まれないエピトープ・ミスマッチ 抗原・アレルが推定できる(曖昧な交差反応性に頼らず)

# 解析

◆IgG性抗体と補体結合性抗体の反応様態の違い

◆複数施設参加による施設間差の確認

## **Beads count**

200

**100** 

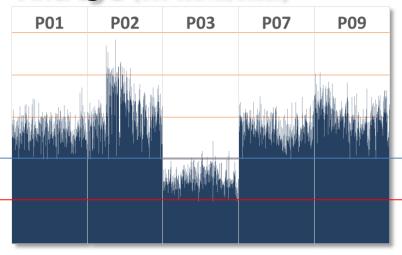
<del>50</del>

**100** 

<del>50</del>

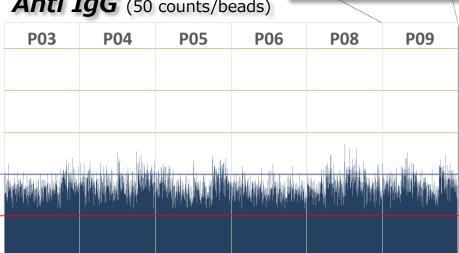
#### One Lambda

#### **Anti IgG** (100 counts/beads)



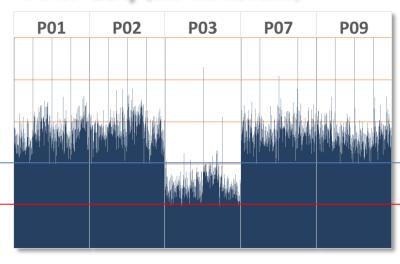
#### **LIFECODES**



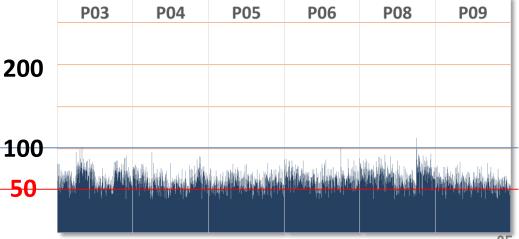


K1 ~ K4 all beads

### **Anti-C1q** (100 counts/beads)



### **Anti-C3d** (40 counts/beads)

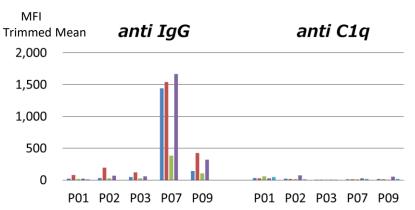


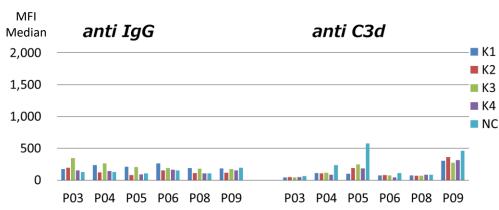
## **Control Beads**

#### One Lambda

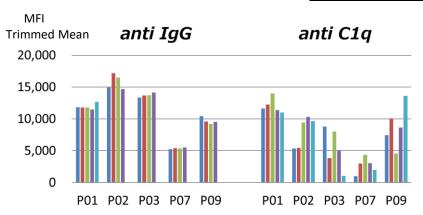
#### **LIFECODES**

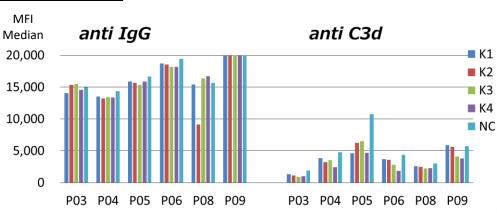
#### **Negative Control Beads**





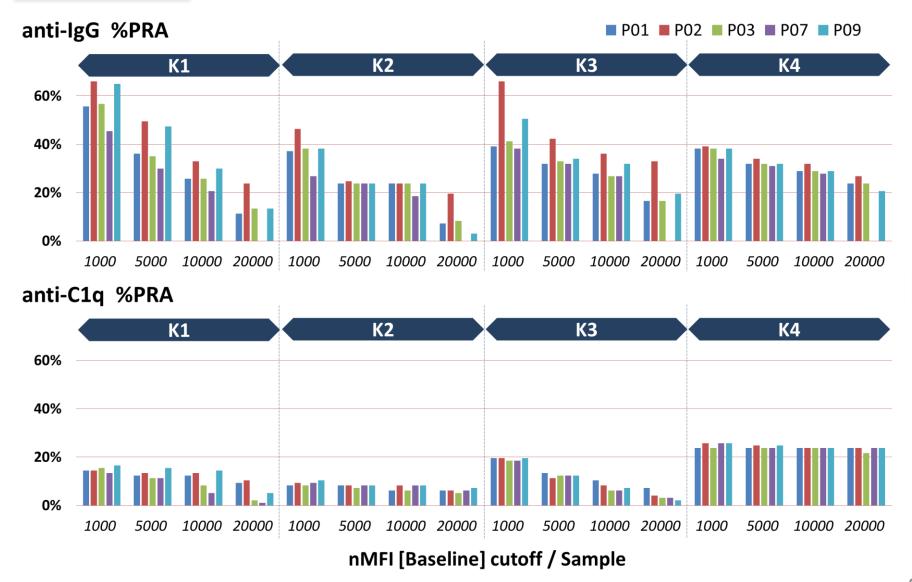
#### **Positive Control Beads**





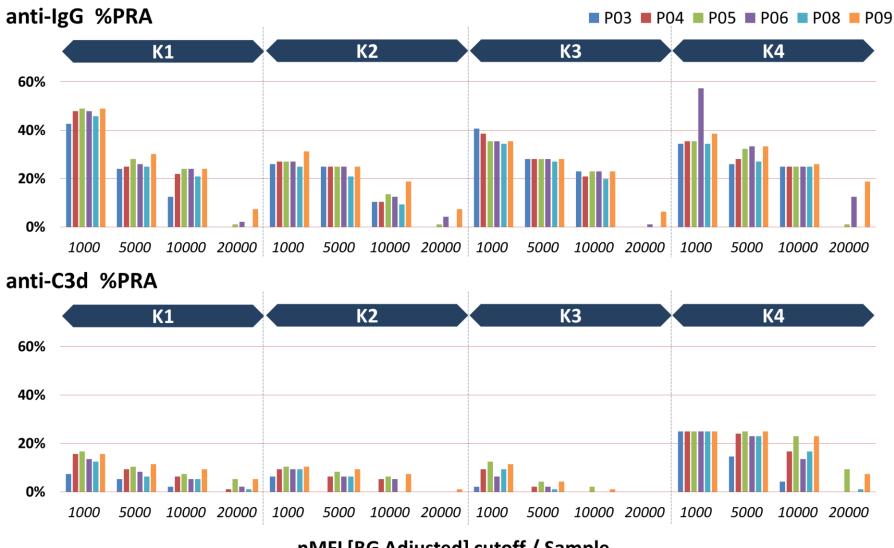
# 抗体陽性率:施設別

#### One Lambda



# 抗体陽性率:施設別

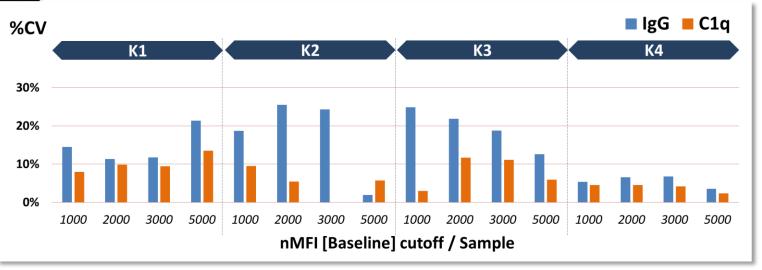
#### **LIFECODES**



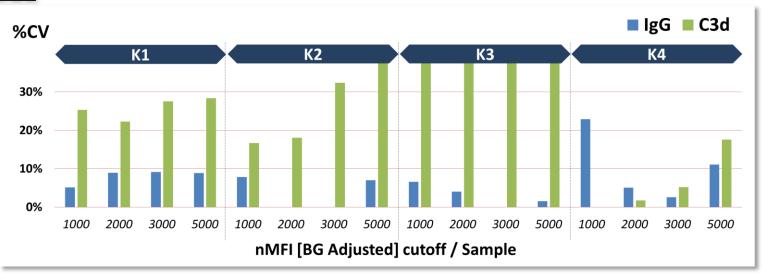
nMFI [BG Adjusted] cutoff / Sample

# 抗体陽性率:カットオフ別の施設間バラツキ

#### One Lambda



#### **LIFECODES**



# 解析結果

◆複数施設参加による施設間差の確認

Beads count:全施設ほぼ適正(1施設半量法)

Control Beads: 1施設NC高値で全体のnMFI低下

<u>nMFI施設間差</u>: nMFI(IgG)低値で%PRAに差があり

カットオフ1,000前後ではDSA判定に差が生じる

# 反応強度:

C1qの反応強度は高め、C3dの反応強度は低め

# <u> バラツキ</u> :

IgG>C1q、IgG<C3d で逆傾向

# Do Not Rely on MFI

- In conclusion, the road toward HLA antibody detection and identification is still (and may always ・ 臨床決定をするMFI値の信頼性についての調査 be) under construction. Will there ever be a test for HLA antibodies with 100% specificity and
- sensiSABの導入はMFIが定量化可能な値であったという信念をもたらした
- desire for a "perfect" test is strong by the sense of this "perfect" test was a since of the could be determine and quantify antibody specificity with unequivocal accuracy, how would those results be application clinical setting? Even the ideal test would provide only a single result, a snapshot in
- time 臨床と検査の現在の習慣におけるMFIの使用は有効なのか? single time
- point could, with certainty, predict a clinical outcome? Can the outcome of a glucose tolerance test be contain the country of the country
- biolog技術進展は、th新たな疑問が必然的に生じるごとに従ってい。古い問題はほ

<u>. Moreover, the quantification of HLA antibody provides only a limited scope of its</u>

は確実に残る
pathophysiology, a better understanding of the processes that drive alloantibody production in an

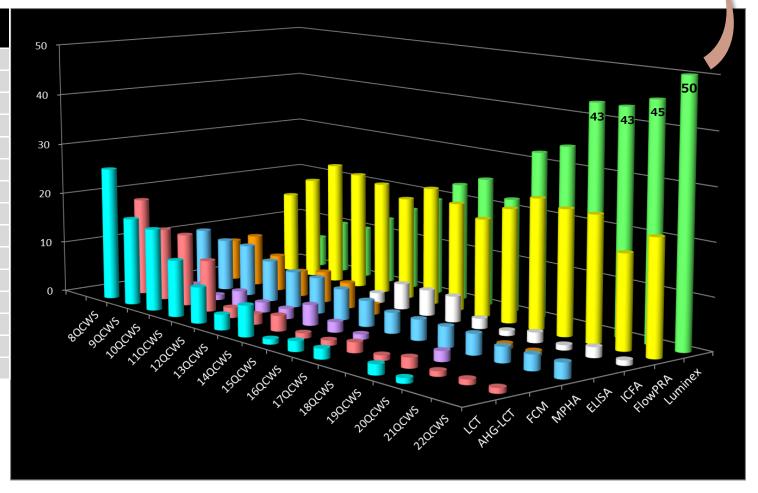
- indiviMFI在当场中的大型 acterize the pathogenicity of a given antibody. Even as
- LA抗体検出と識別の道程は未だ道半ばである questions will inevitably arise. And so, the journey continues....

Personal Viewpoint; Sullivan HC et al. The Road to HLA Antibody Evaluation: Do Not Rely on MFI. Am J Transplant 17, 2017

# JSHI 抗体QCワークショップ参加状況

22QCWS(2018) Luminex 50 Labs LABScreen 44 C1q LIFECODES 4 C3d WAKFlow 26

年度	抗体QC	参加 施設数
2004	8QCWS	38
2005	9QCWS	44
2006	10QCWS	38
2007	11QCWS	37
2008	12QCWS	36
2009	13QCWS	36
2010	14QCWS	41
2011	15QCWS	39
2012	16QCWS	37
2013	17QCWS	49
2014	18QCWS	52
2015	19QCWS	57
2016	20QCWS	58
2017	21QCWS	57
2018	22QCWS	61



#### 結 語

- ◆ 抗ヒトIgGのnMFI値を臨床指標とすることには、施設間差だけでも問題が認められる。
- ◆ひとつの方向性として、臨床的に有効であるか検証できる 補体結合性抗体の測定データの蓄積が必要と考えられる。
- ◆ LCT(CDC)は、施設間での精度維持が困難であることは既に検証済みのため、<u>蛍光ビーズ法での補体結合性抗体の検</u>出法が最も妥当である。
- ◆ C1qかC3dかの答えはその先にある。