

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

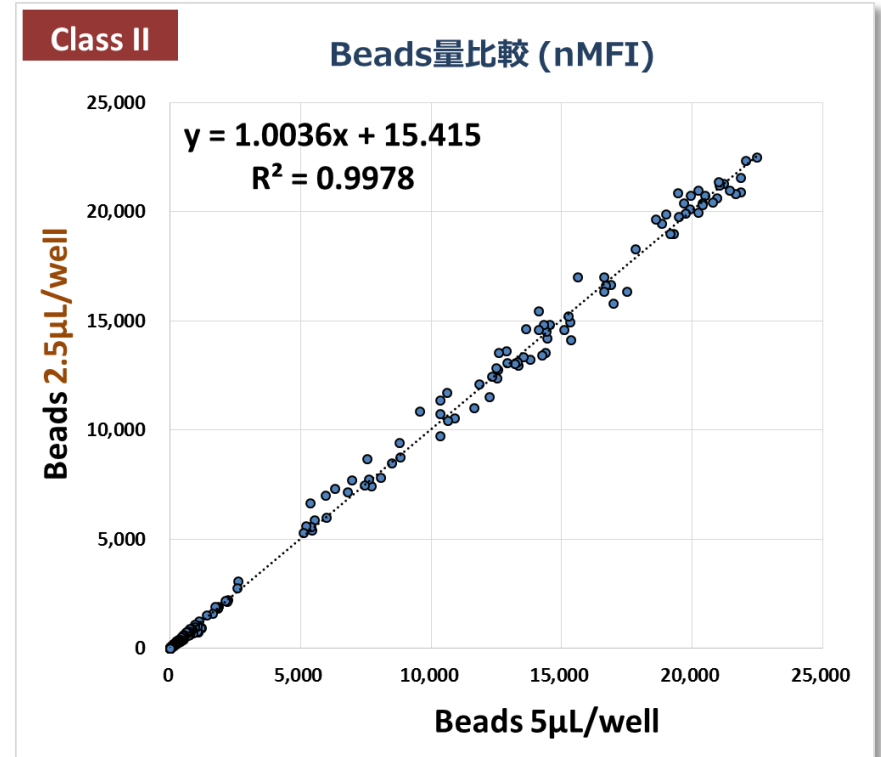
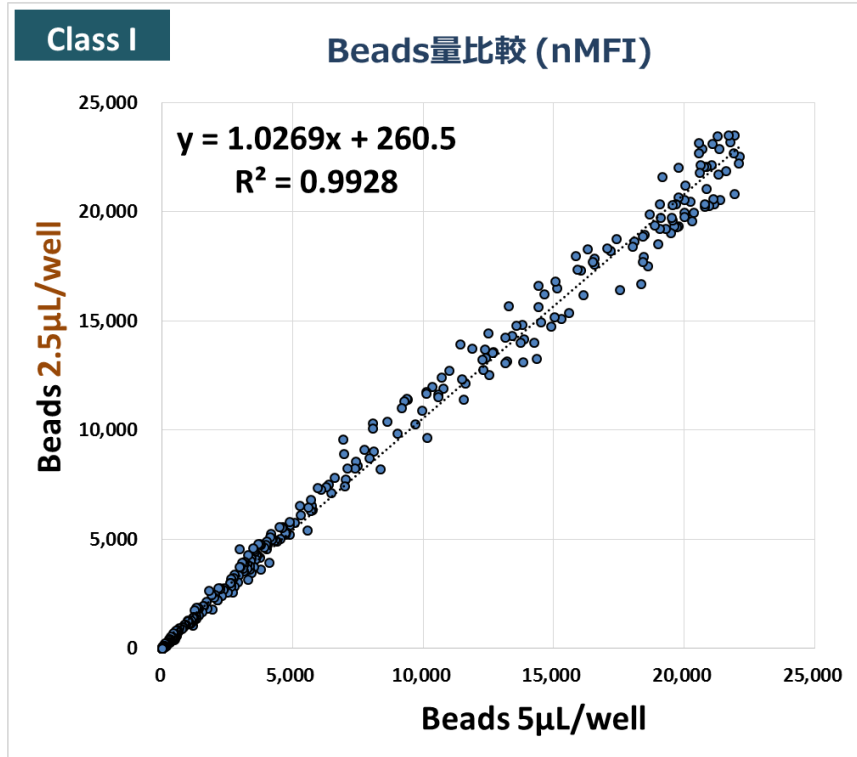
Liwski RS, et al. Hum Immunol. 78 (2017) 489–499

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

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)

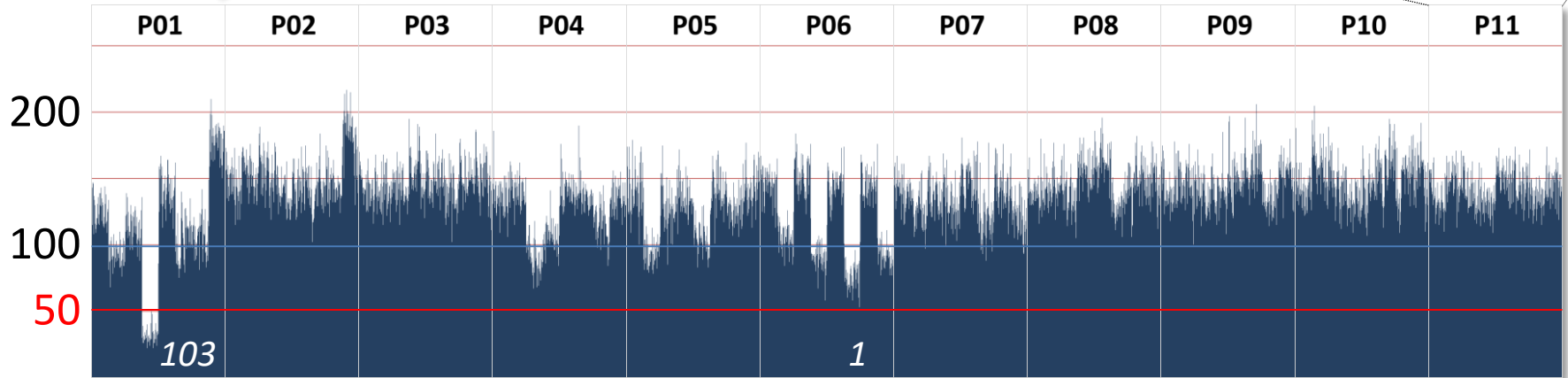
判ったこと

施設間差がある！

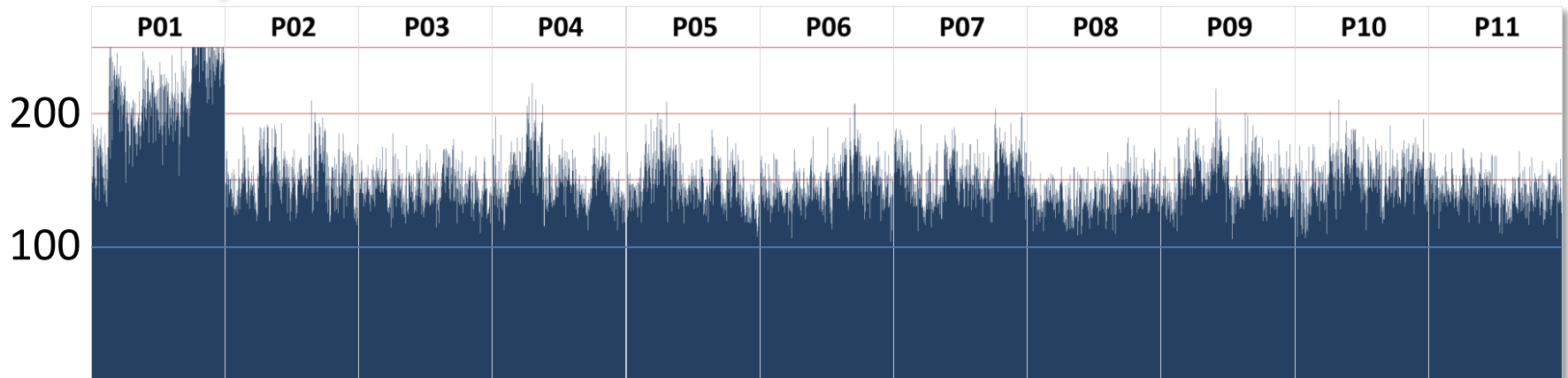
Beads count

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

Beads 2.5 μ L



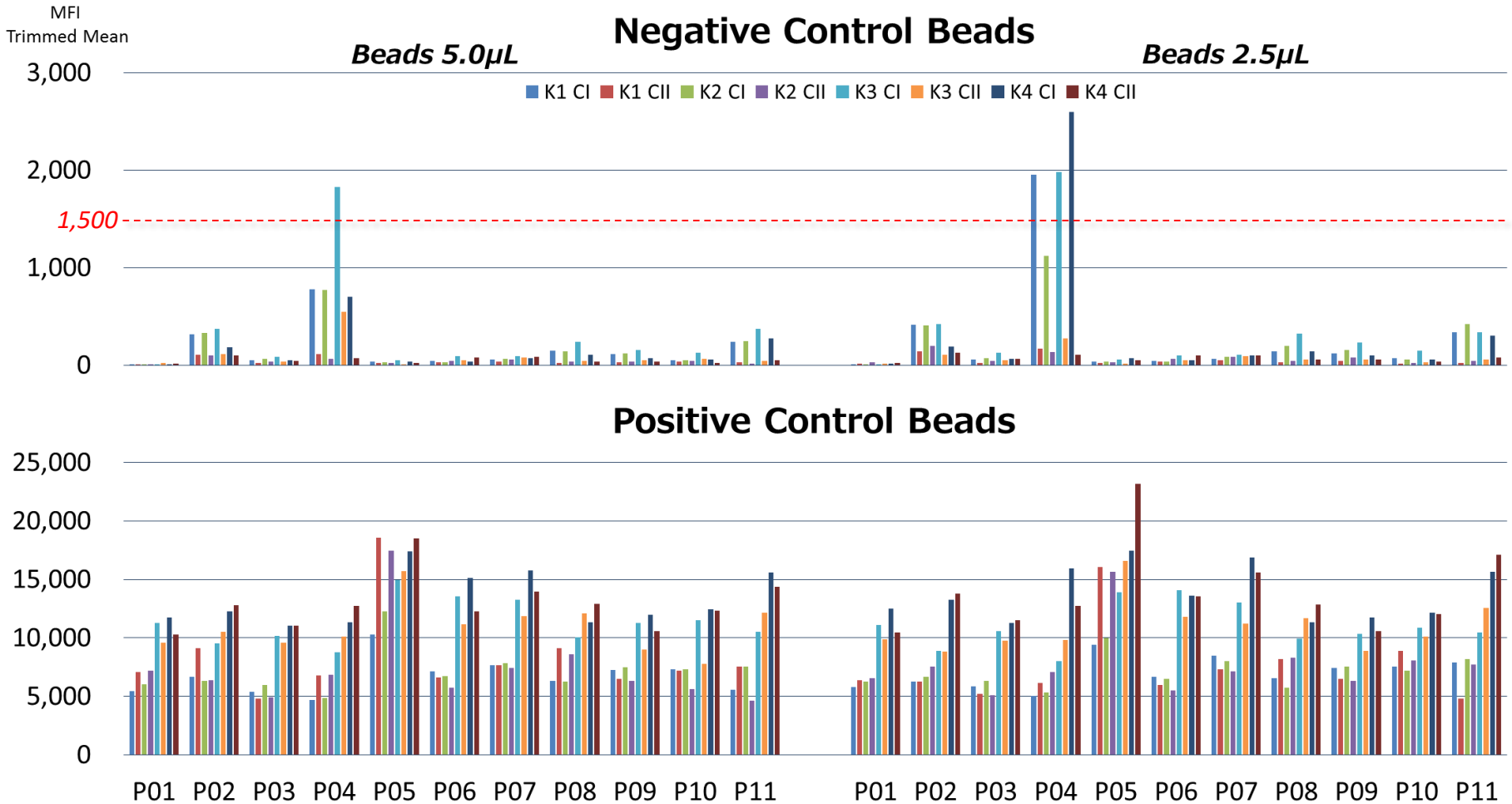
Beads 5.0 μ L



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

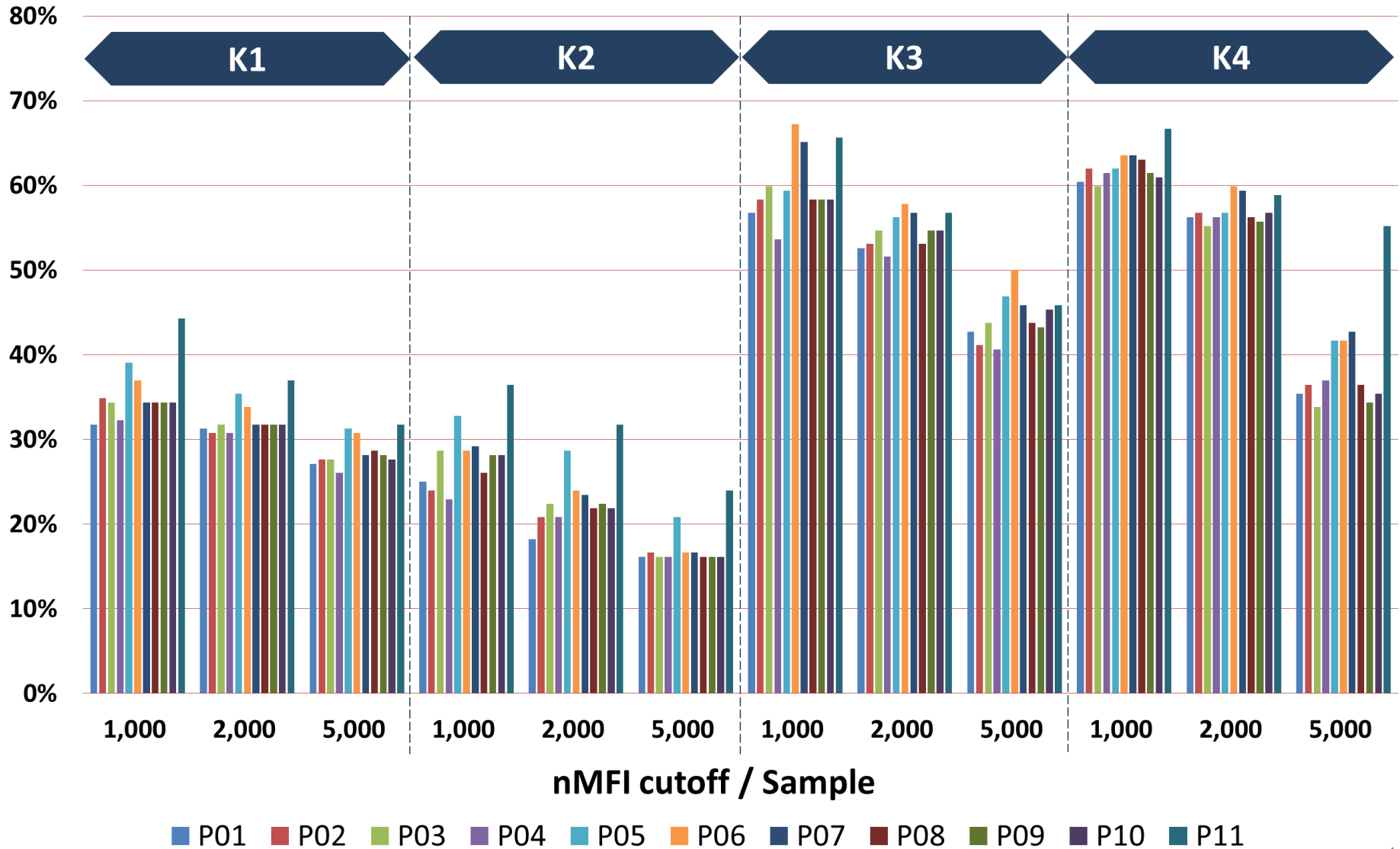
The NC value is usually less than 500 except for serum samples with a high background. **It should always be lower than 1500** and less than or equal to half of the PC value.

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

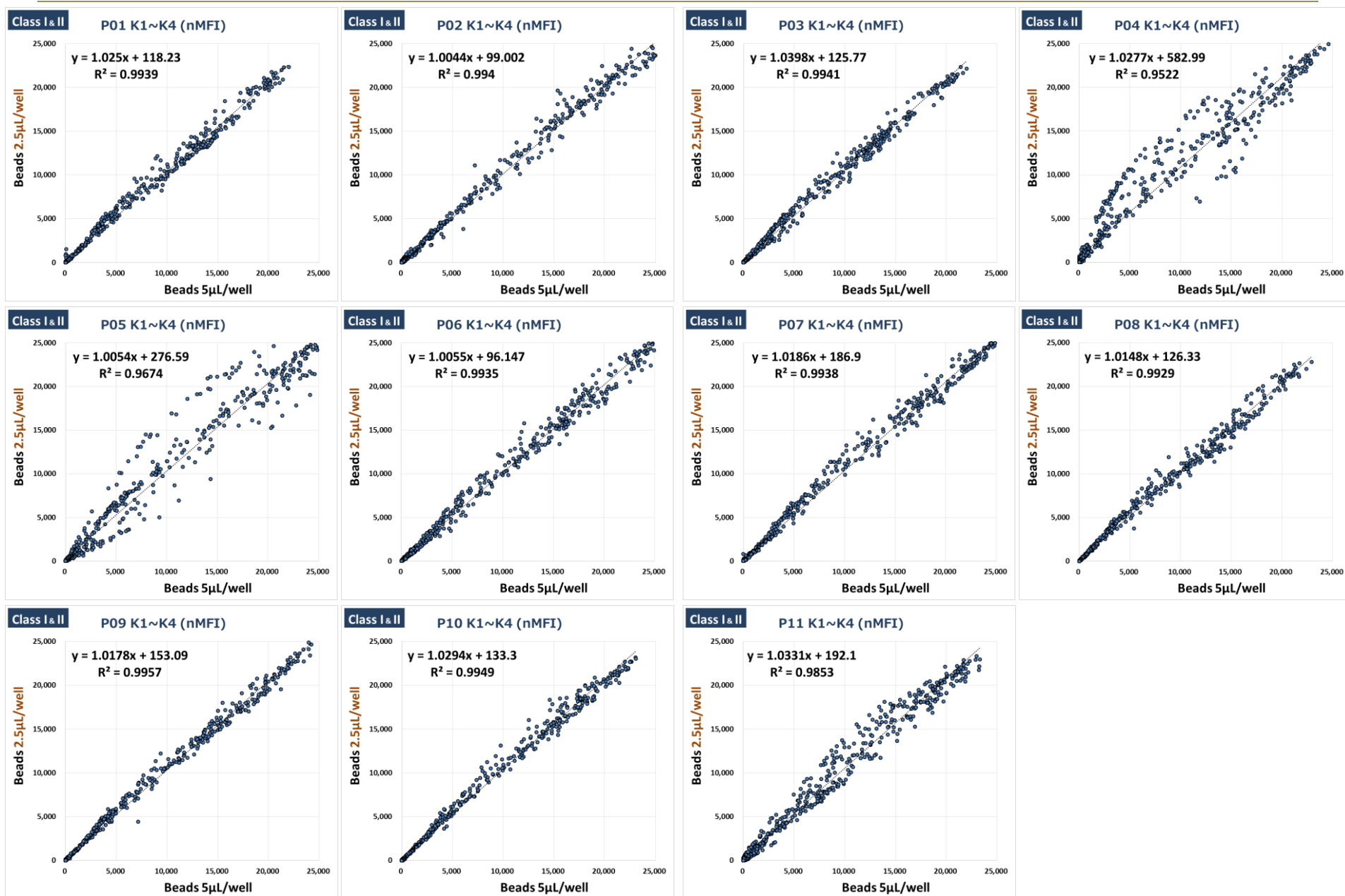
(LS-LSCN-PI-EN-00, Rev 255)

抗体陽性率：施設別

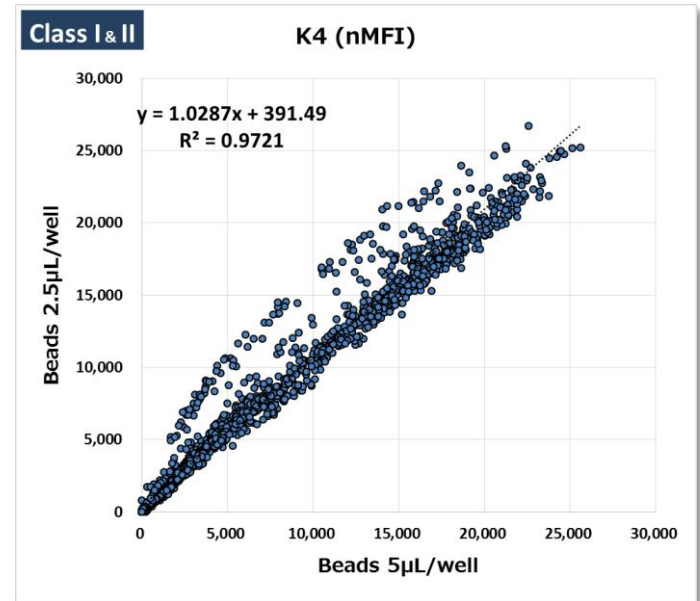
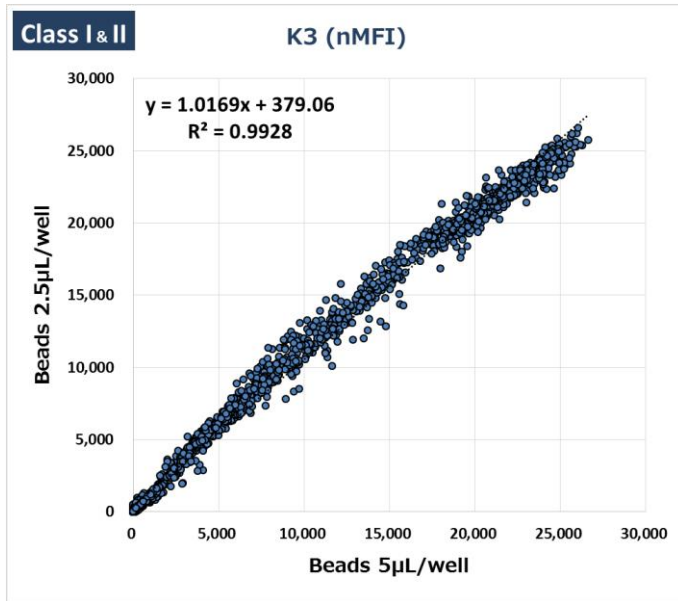
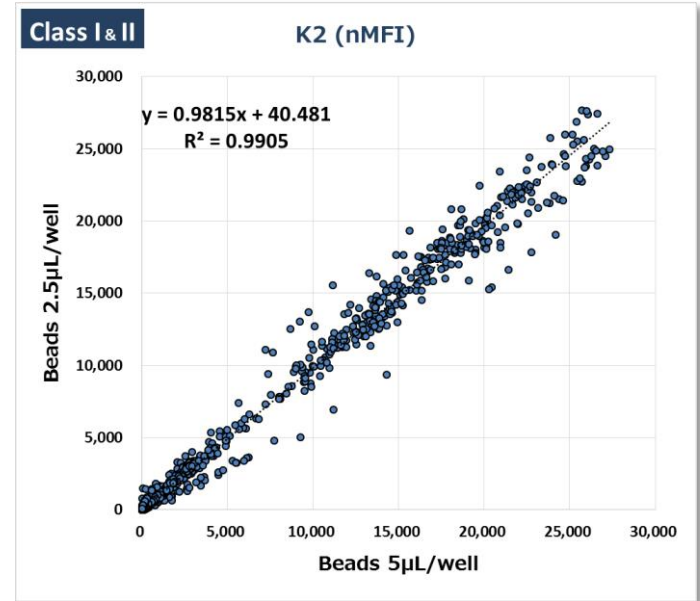
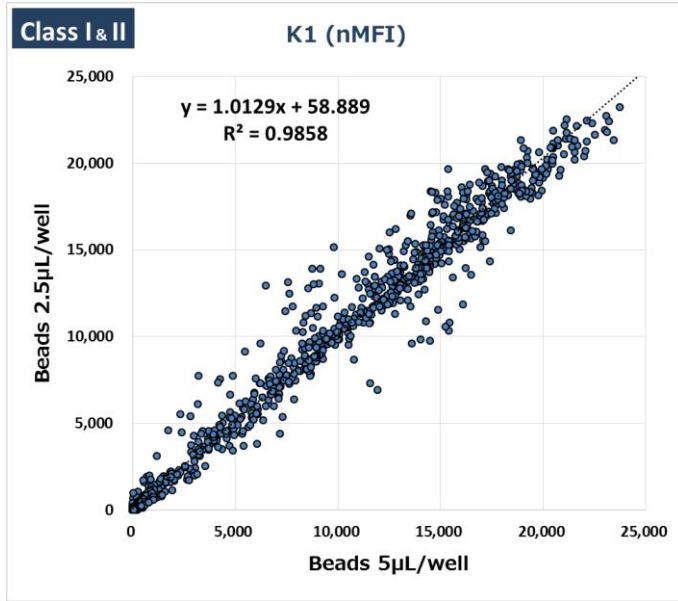
%PRA 抗体陽性率の違いは特異性判定の微妙な相違に直結する



Beads 2.5 μ L vs 5.0 μ L 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！

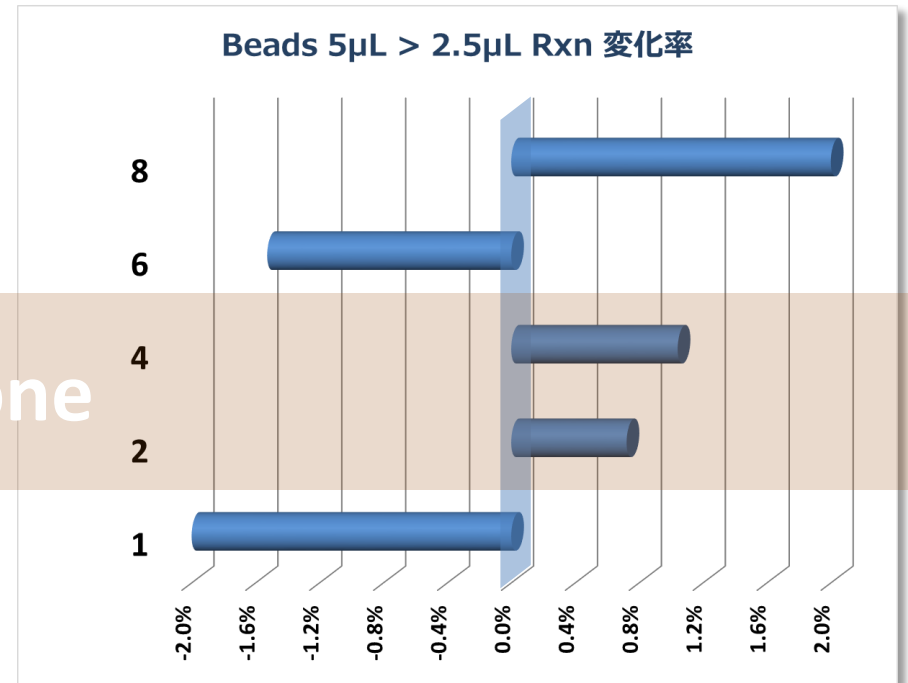
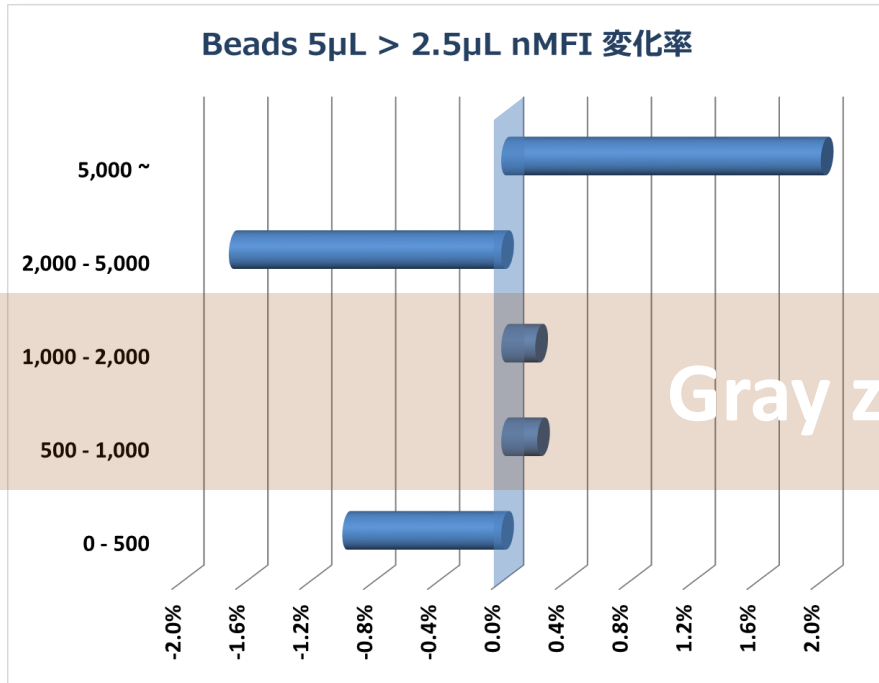
半量では測定値分布が陽性方向にシフトする！

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

K4 P09

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！

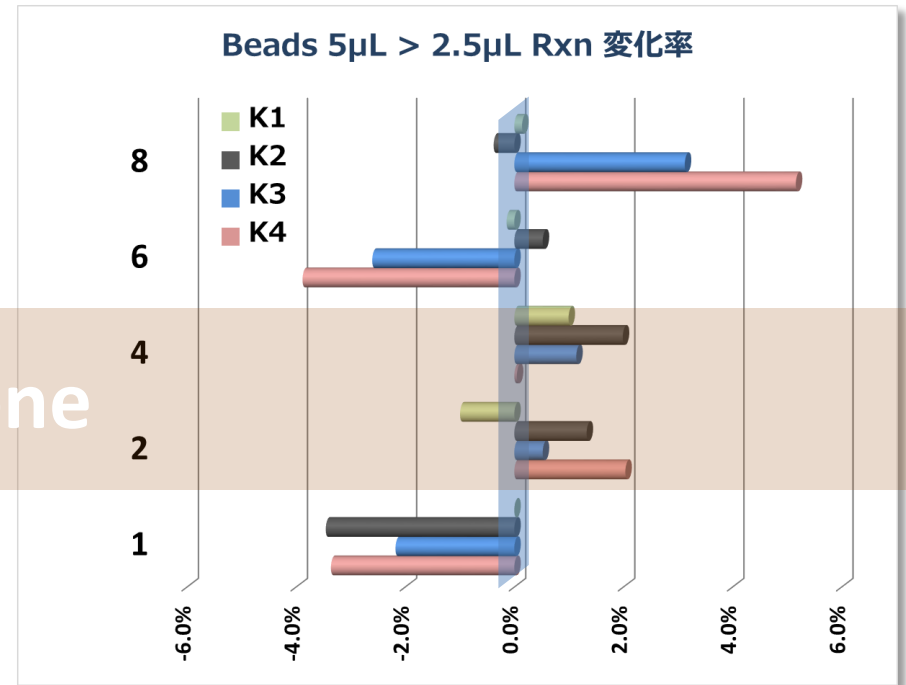
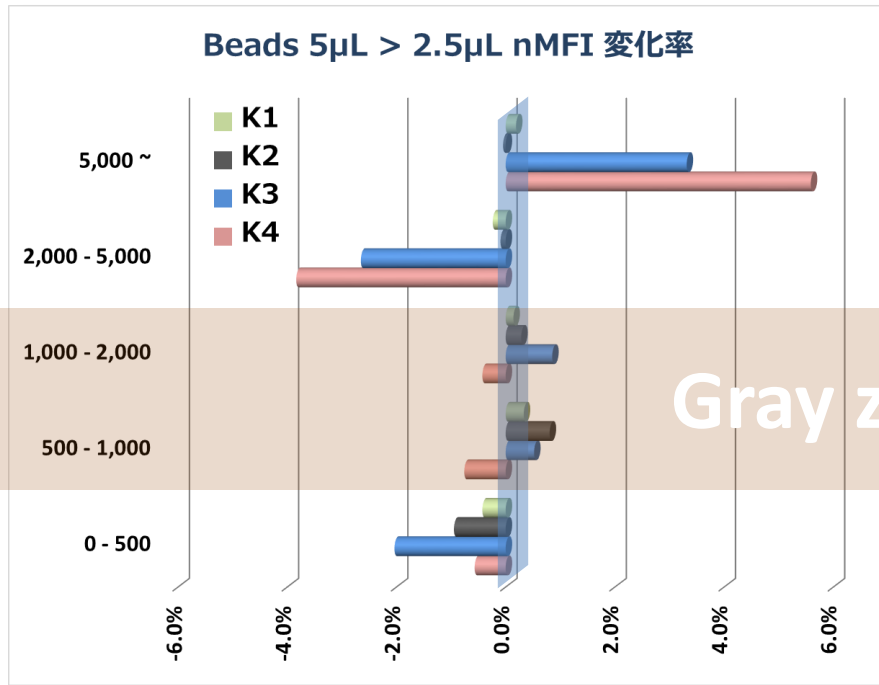
弱陽性領域では測定値分布の変化率が逆転している！

%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）



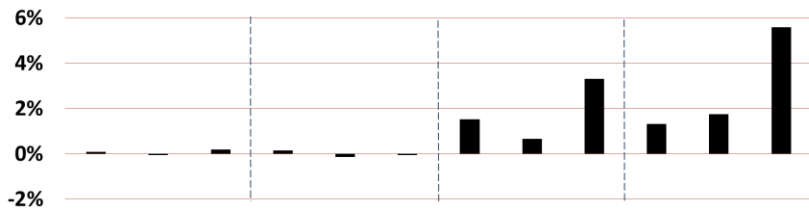
%PRA nMFI ≥ 5,000

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

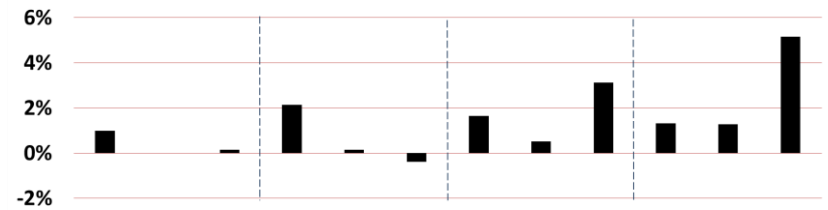
スコア (Rxn) は、前後のシグナル強度の関係とエピソード情報からソフトウェアが自動的に判定する

Beads 2.5 μ L vs 5.0 μ L 抗体陽性率：サンプル別

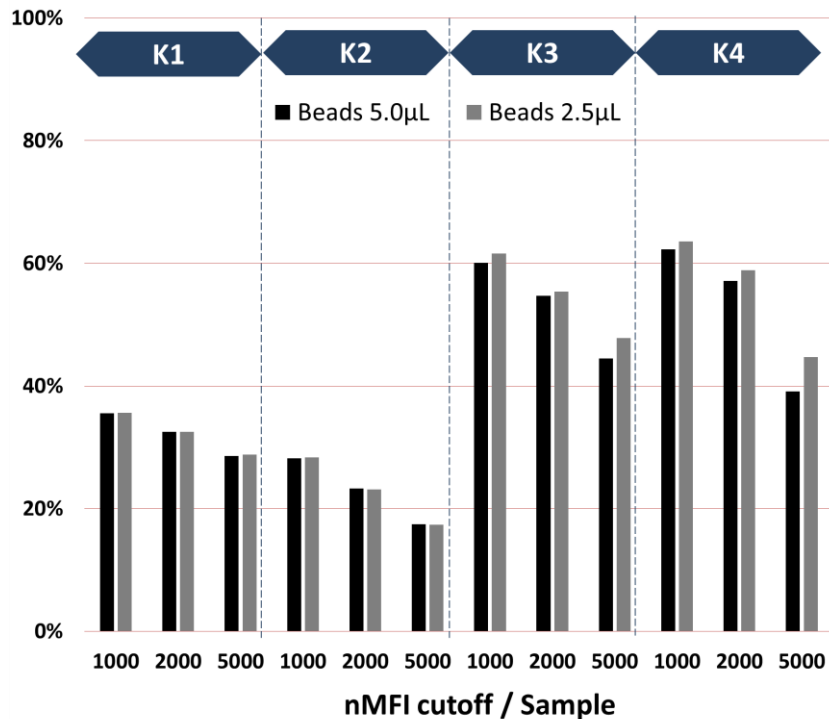
変化率の差



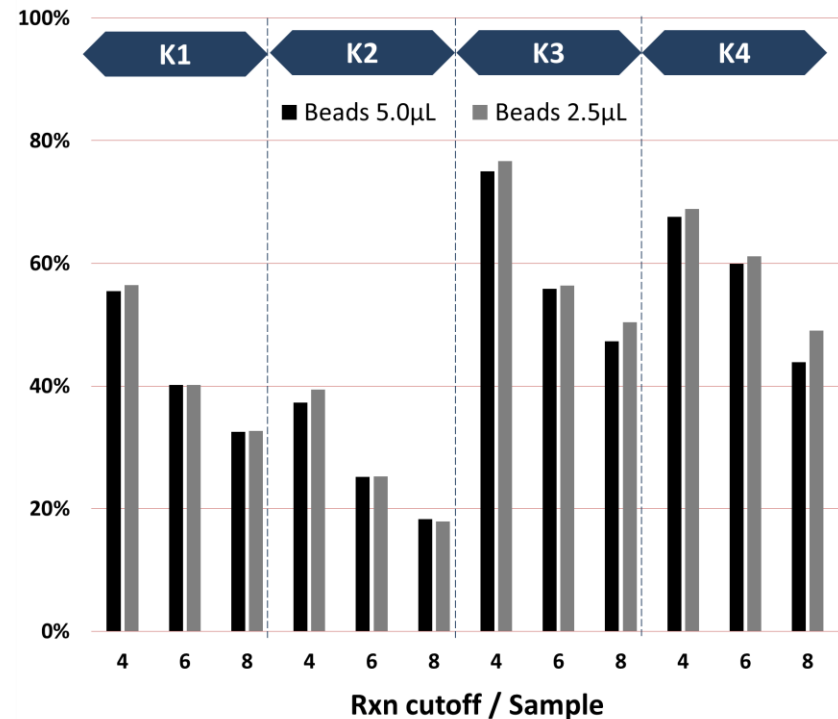
変化率の差



%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！

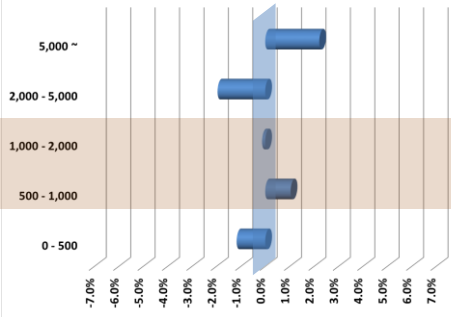
弱陽性領域では測定値分布の変化率が逆転している！

%PRAが高いサンプルは測定値分布の変化率が大きい！

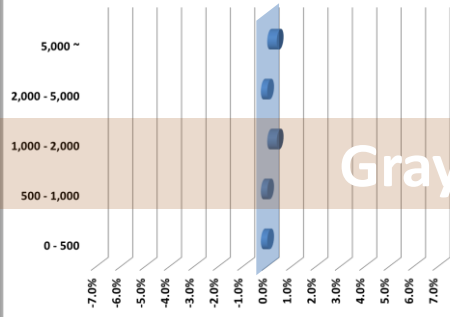
測定値分布の変化は特異性判定に影響する可能性がある！

測定値分布の変化率：施設別

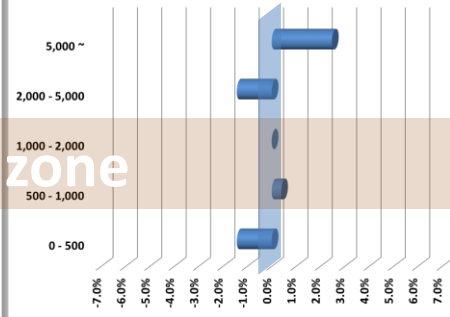
P01 Beads 5 μ L > 2.5 μ L nMFI 変化率



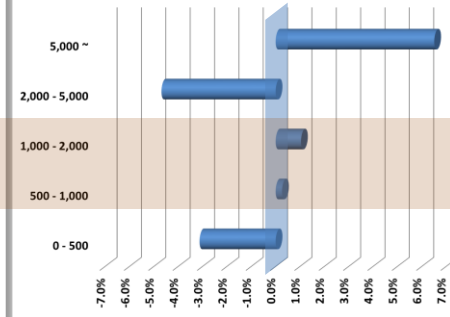
P02 Beads 5 μ L > 2.5 μ L nMFI 変化率



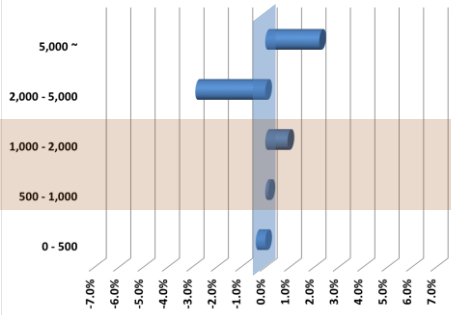
P03 Beads 5 μ L > 2.5 μ L nMFI 変化率



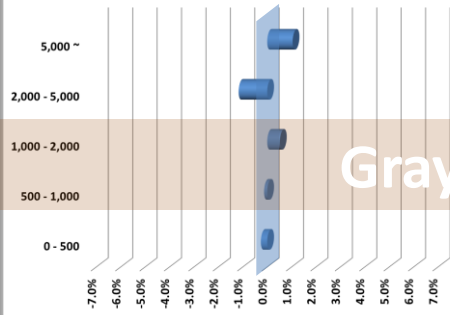
P04 Beads 5 μ L > 2.5 μ L nMFI 変化率



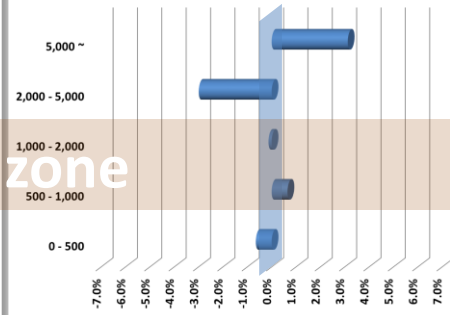
P05 Beads 5 μ L > 2.5 μ L nMFI 変化率



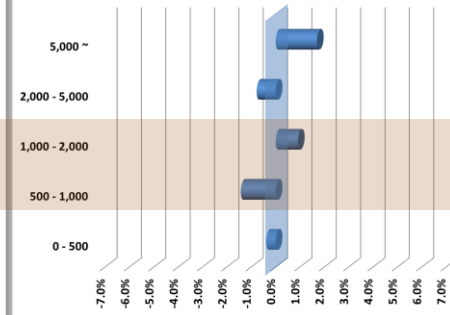
P06 Beads 5 μ L > 2.5 μ L nMFI 変化率



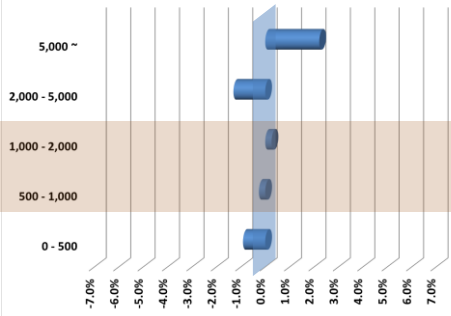
P07 Beads 5 μ L > 2.5 μ L nMFI 変化率



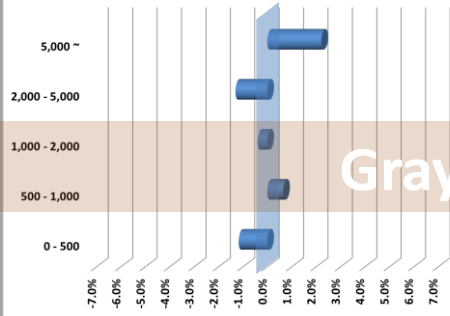
P08 Beads 5 μ L > 2.5 μ L nMFI 変化率



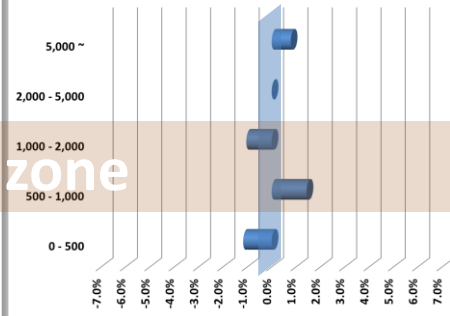
P09 Beads 5 μ L > 2.5 μ L nMFI 変化率



P10 Beads 5 μ L > 2.5 μ L nMFI 変化率




P11 Beads 5 μ L > 2.5 μ L nMFI 変化率



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！

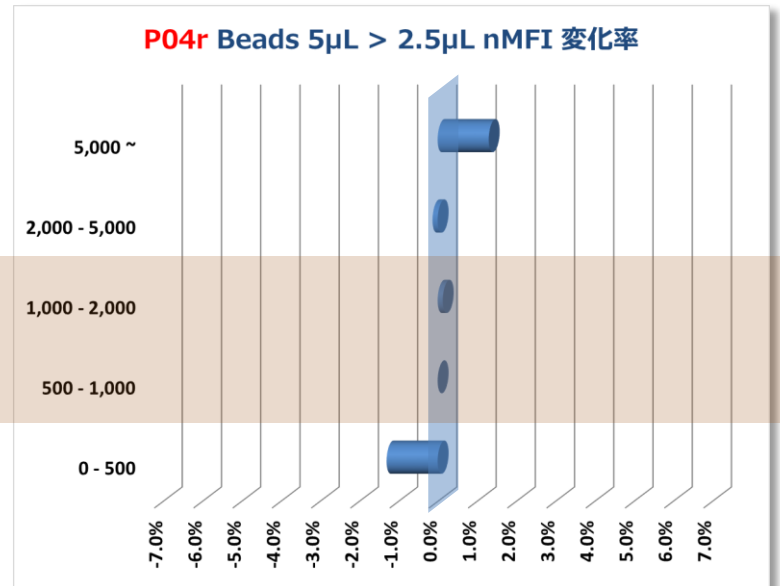
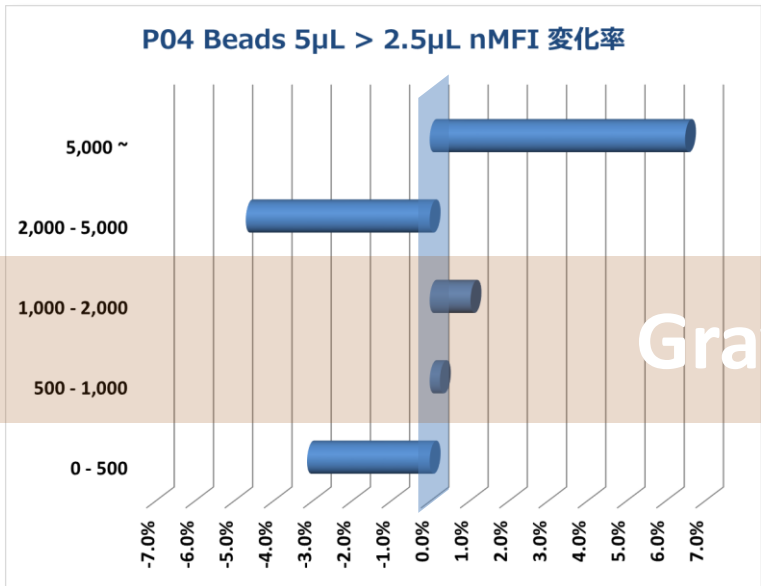
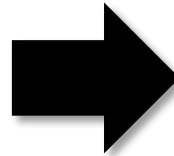
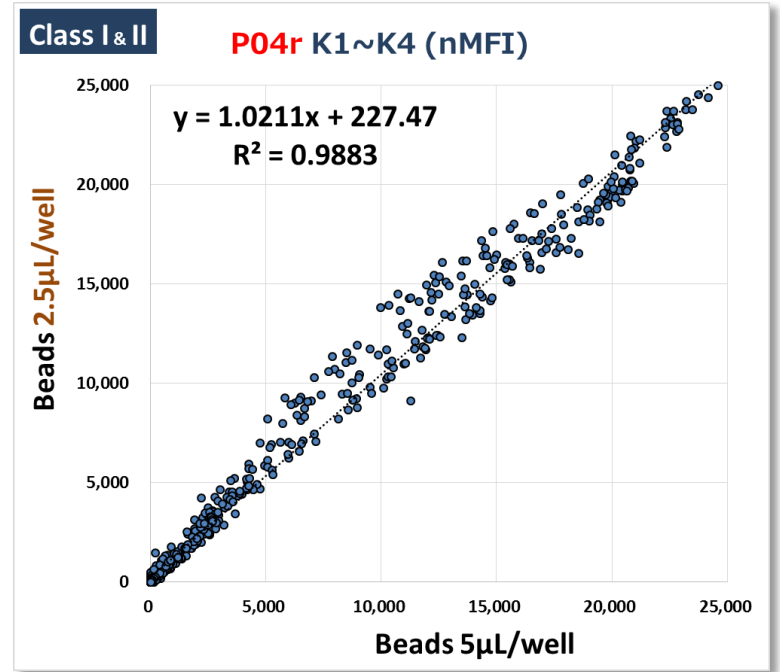
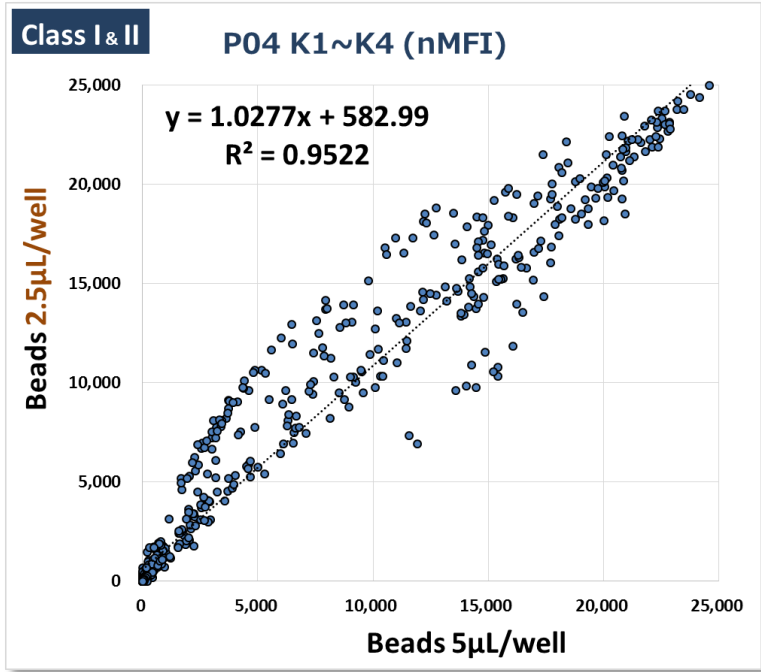
弱陽性領域では測定値分布の変化率が逆転している！

%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！

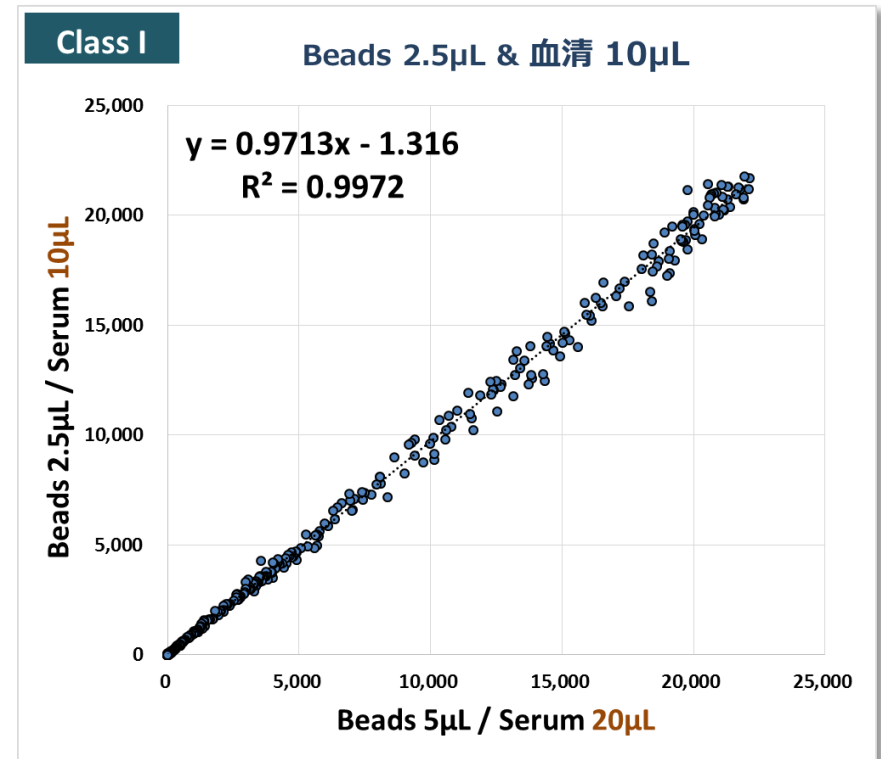
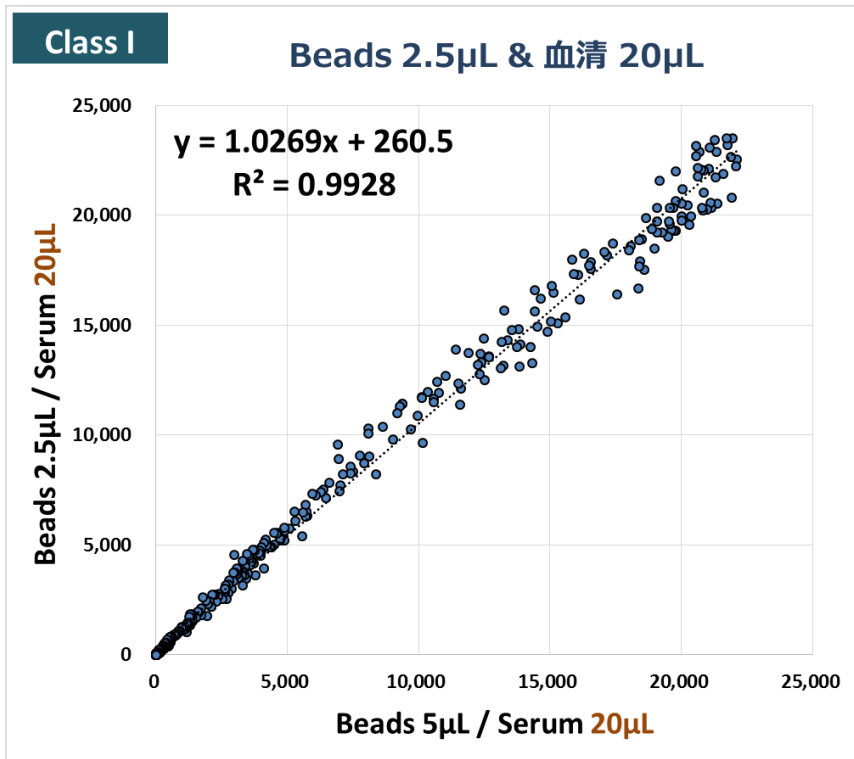
%PRAが高いサンプルは測定値分布の変化率が大きい！

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！