

第12回HLA-QCワークショップ
抗体部門
－LABScreen－

大阪府赤十字血液センター
高 陽淑

今回の解析の要点

- 参加施設における抗体有無の結果比較
- 抗体有無結果の不一致の原因調査
- 判定結果比較
- 判定結果の不一致原因調査
- IgM性抗体検出の比較
- 総合評価
- 今後の課題

抗体有無の結果比較と不一致の原因調査

*対象

抗体有無の検査のみであったSH2001 ~ 2004
(IgG性抗体)

*方法

結果が不一致となった検体において
反応性に差があったbeadの値*を比較。

*Mixed Ratio

*single antigen Raw date (Normal)

抗体の有無結果(クラス)

Lab ID	SH2001	SH2002	SH2003	SH2004	SH2005	SH2006
20S002	8	4	1	1	8	8
20S011	8	1	1	1	8	8
20S012	8	1	8	8	8	8
20S013	N.T.				8	8
20S018	8	1	1	1	8	8
20S020	8	1	4*	1	8	8
20S026	8	1	1	1	8	8
20S030	8	8	1	1	8	8
20S033	8	8	1	1	8	8
20S035	N.T.				8	8
20S036	8	8	1	1	8	8

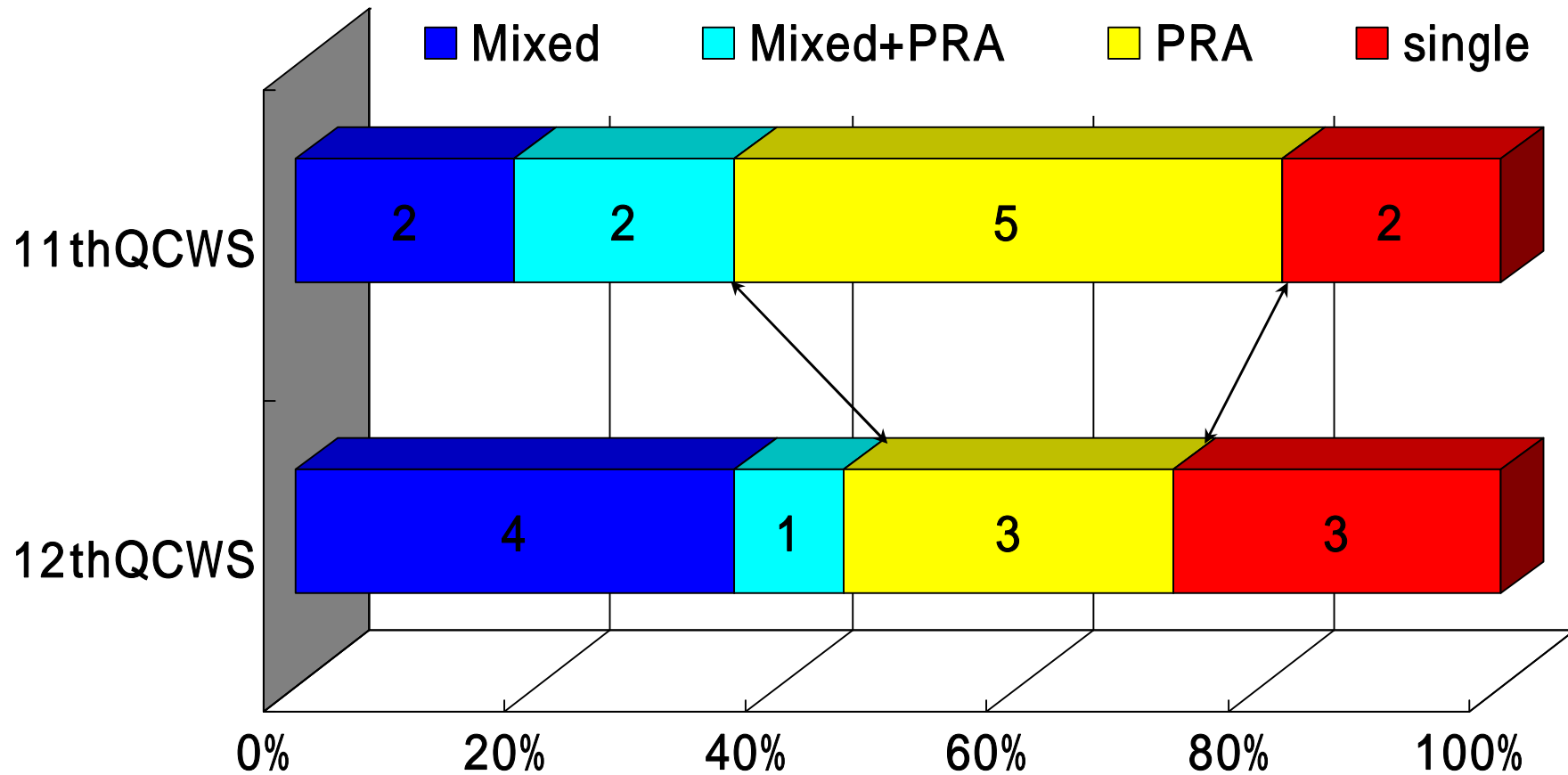
*バックグラウンドが高く判定は保留

抗体の有無結果(クラス)

Lab ID	SH2001	SH2002	SH2003	SH2004	SH2005	SH2006
20S002	8	1	1	8	1	8
20S011	8	1	1	8	1	8
20S012	8	1	1	8	8	8
20S013	N.T.				8	8
20S018	8	1	1	8	1	8
20S020	8	1	4*	8	1	8
20S026	8	1	1	8	1	8
20S030	N.T.					
20S033	8	1	1	8	1	8
20S035	N.T.				1	8
20S036	8	1	1	8	8	8

*バックグラウンドが高く判定は保留

スクリーニングの目的で用いた試薬の比較

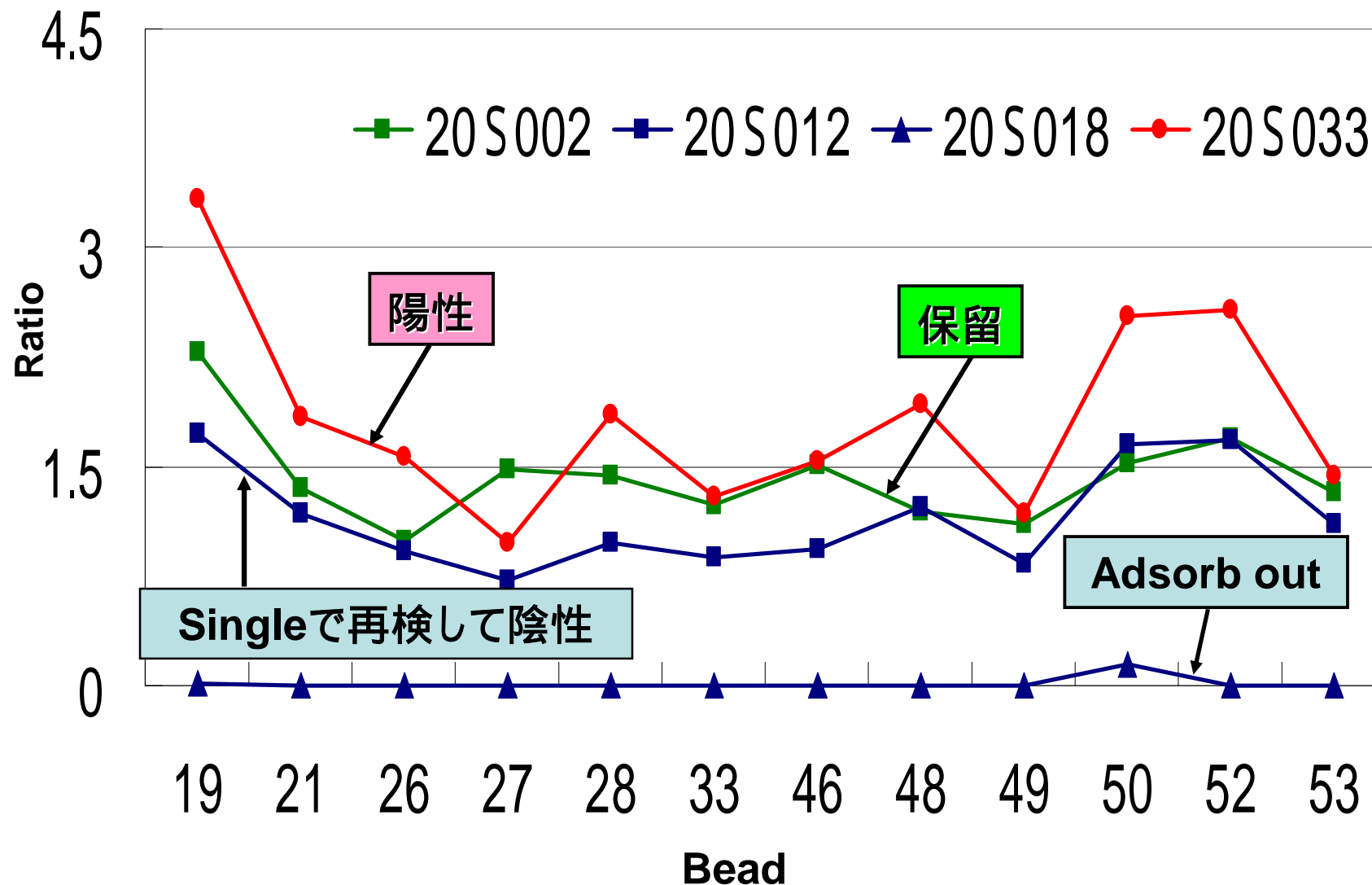


抗体有無の結果に不一致があった検体(クラス)

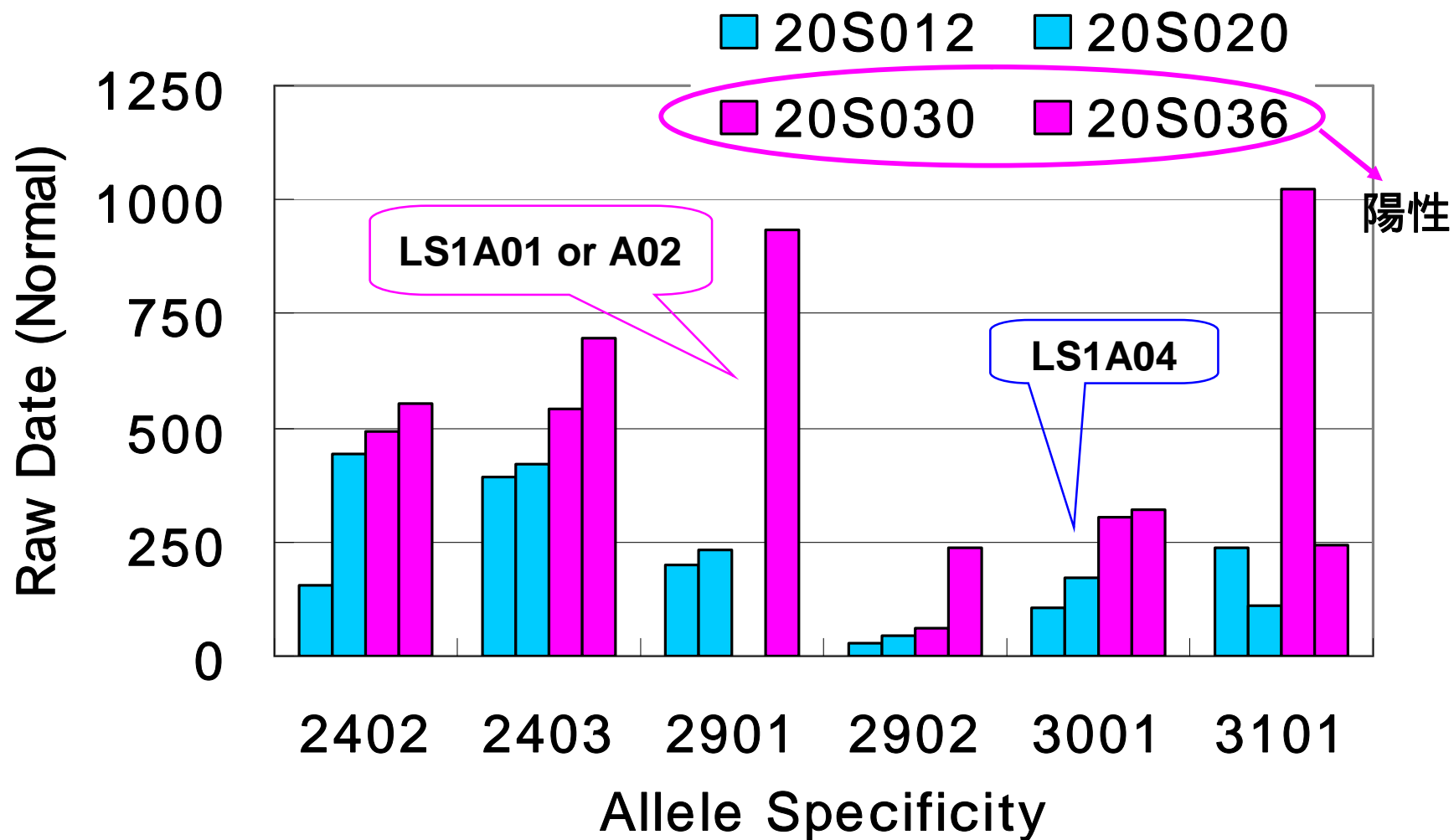
Lab ID	MIX	PRA	Single	SH2002	SH2003	SH2004
20S002	14			4	1	1
20S018	14	11		1	1	1
20S026	13			1	1	1
20S033	14			8	1	1
20S011		11		1	1	1
20S012	14		002(Group4)	1	8	8
20S020			001(Group4)	1	4*	1
20S030			008(Group1)	8	1	1
20S036		11	007+008(Group1,2)	8	1	1

*バックグラウンドが高く判定は保留

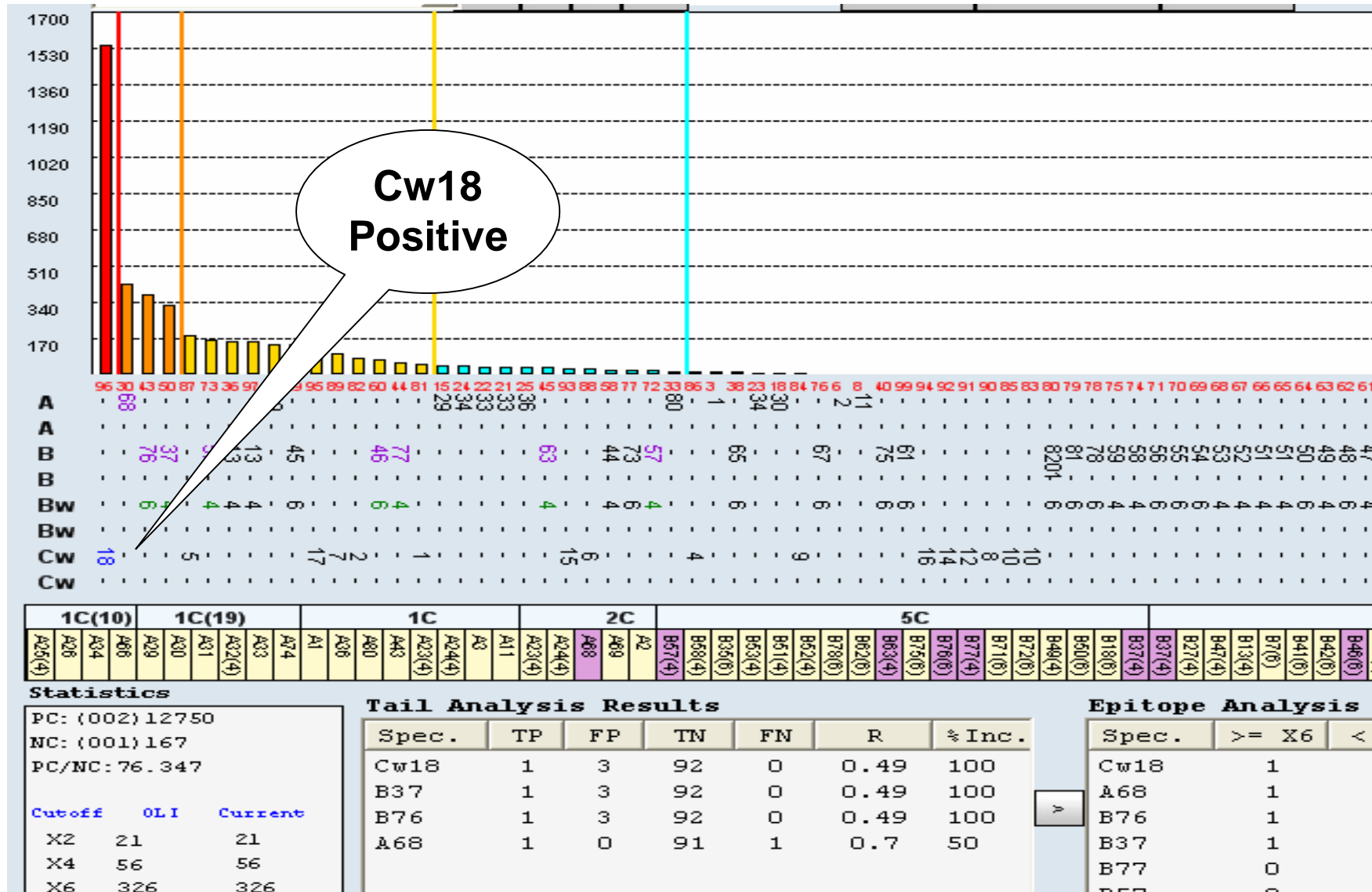
SH2002の反応性比較 (Mixクラス :Lot14)



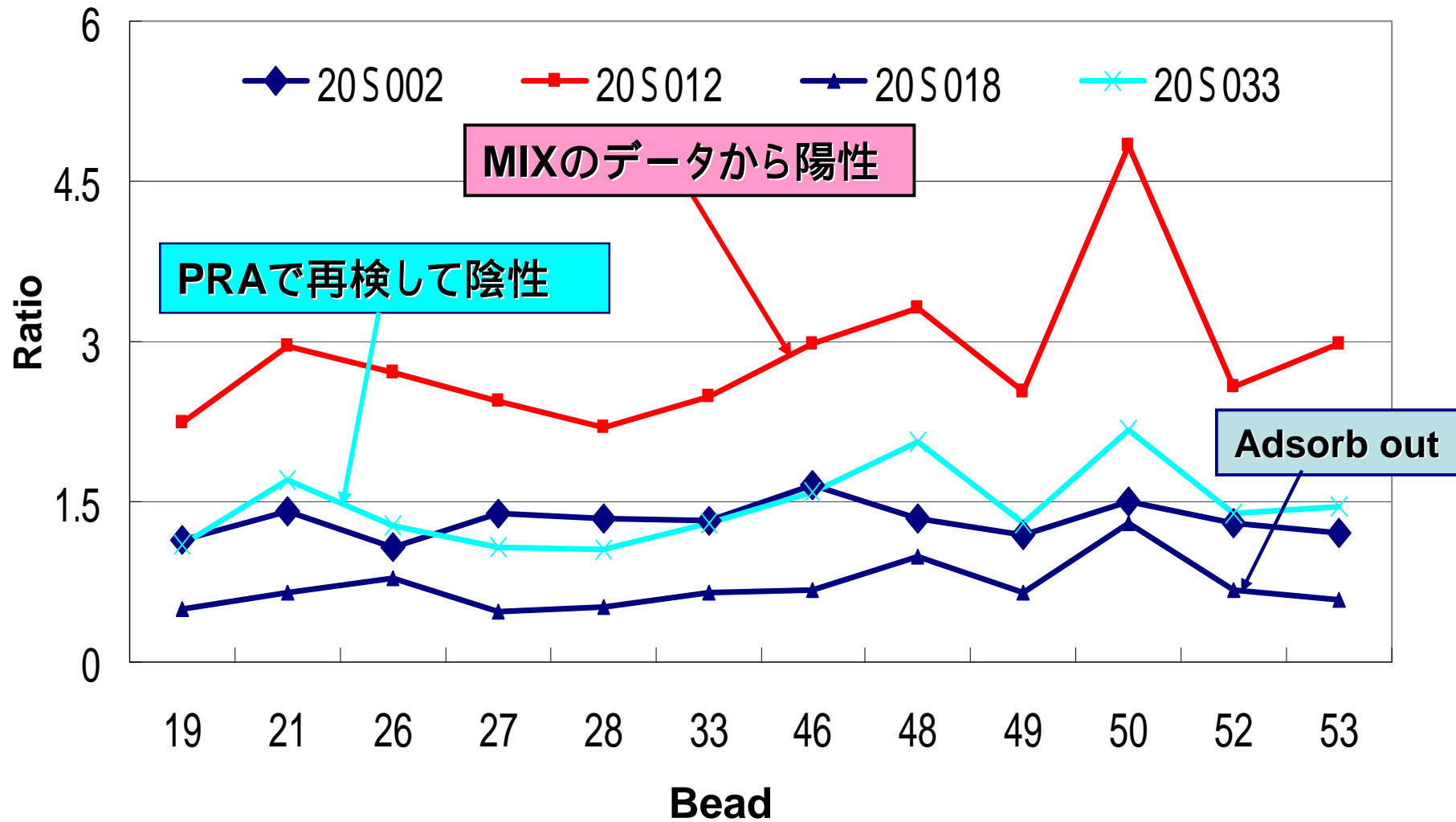
SH2002の反応性比較 (single antigen)



SH2003の反応性 (single: Group4 Lot 002)



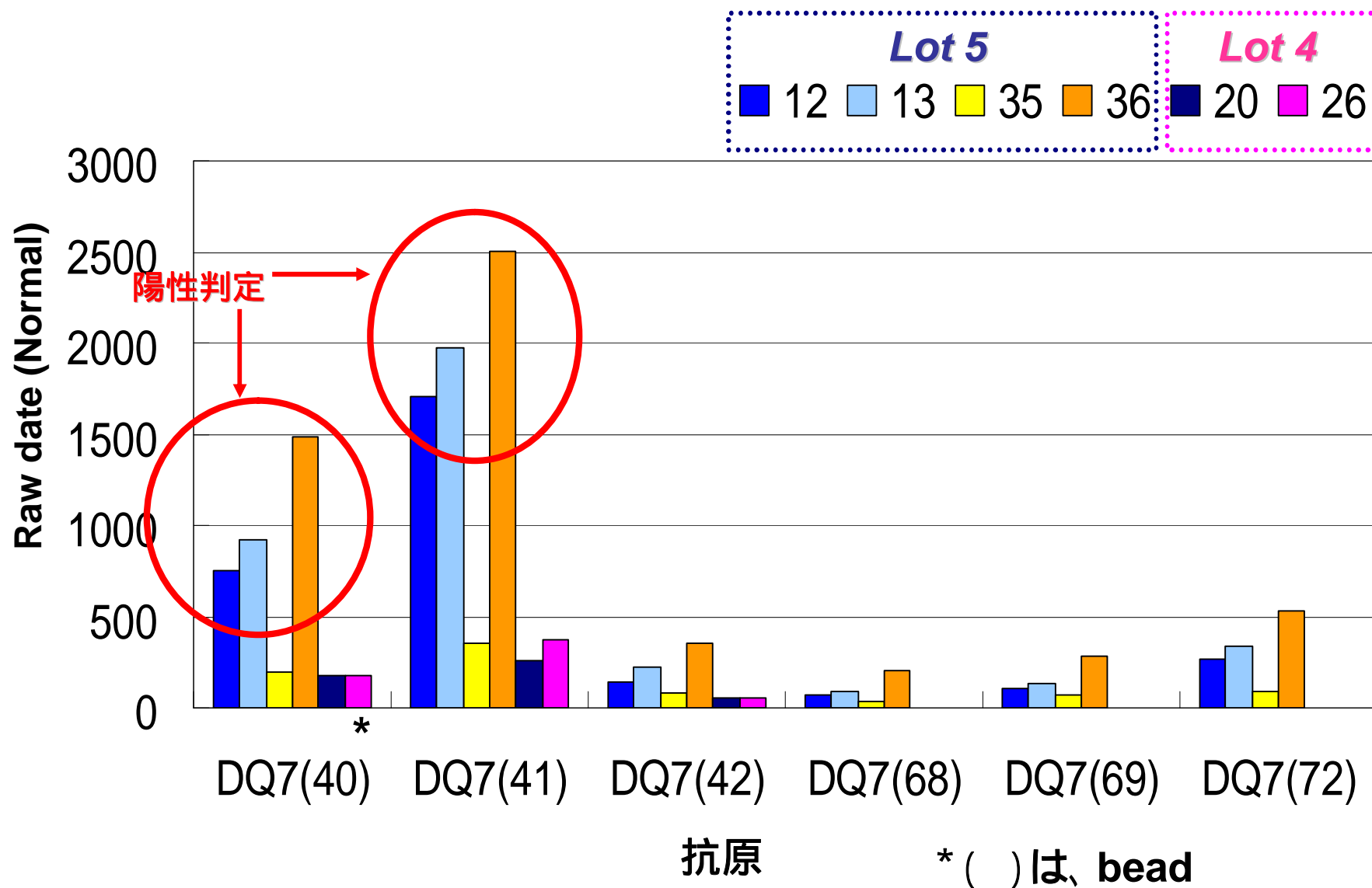
SH2004の反応性比較 (Mixクラス :Lot14)



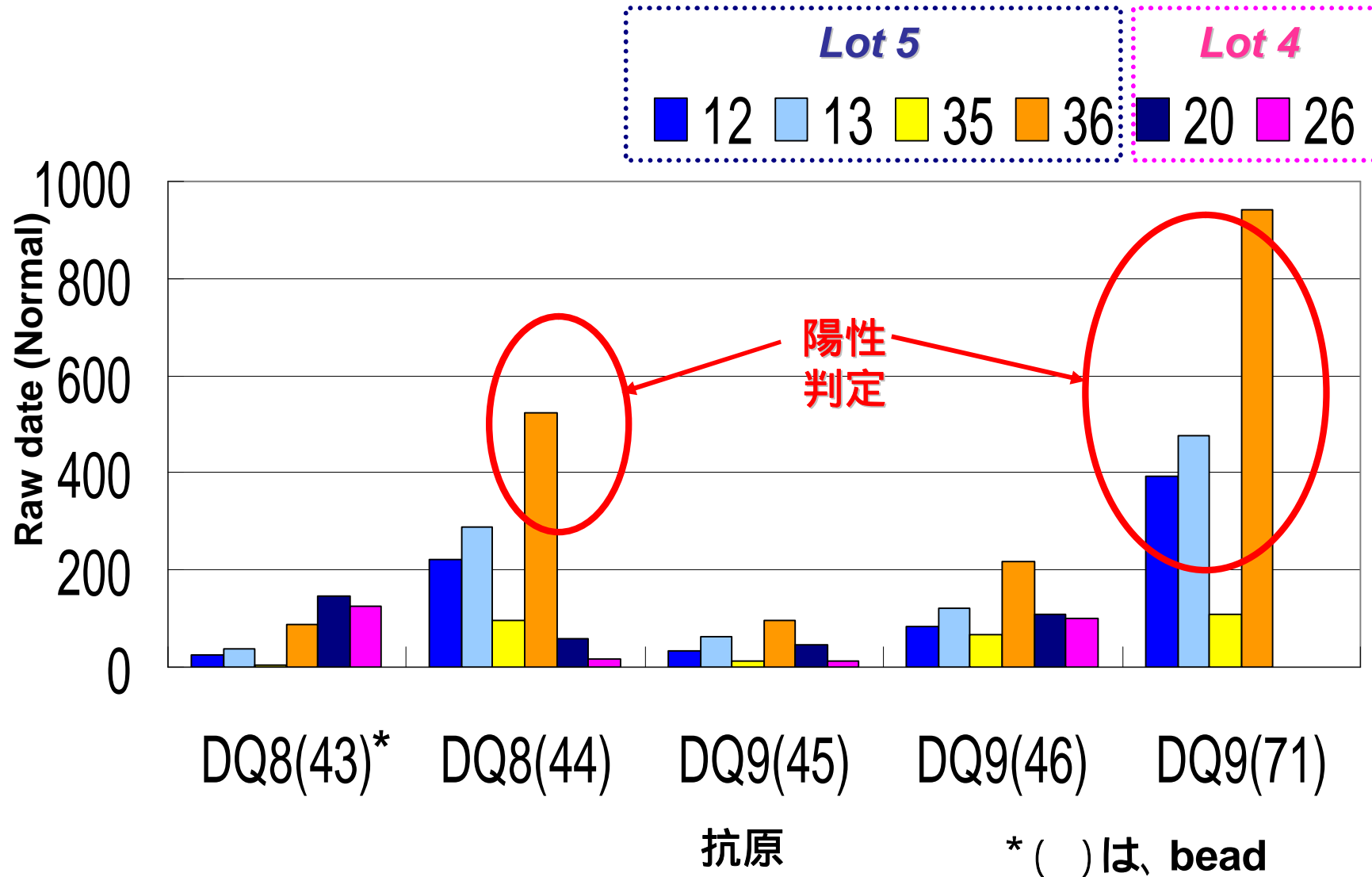
抗体有無の結果に不一致があった検体(クラス)

Lab ID	MIX	PRA	single	SH2005
20S002	14			1
20S018	14	11		1
20S026	13			1
20S033	14			1
20S011		11		1
20S012	14		005	8
20S013			005	8
20S020			004	1
20S035			005	1
20S036		11	005	8

DQ7抗原に対する反応性比較 (S H2005)



DQ8,9抗原に対する反応性比較 (S H 2005)



抗体有無の結果が不一致となった主な原因

スクリーニング試薬の選択

Mixedを用いる場合

Cut off Ratioの設定の違い

微妙な判定である場合の進め方

(再検の有無・試薬の選択)

single antigenを用いる場合

Lotによって検出できる抗体特異性の違い

判定結果の比較と不一致の原因調査

*対象

抗体特異性の検査を実施したSH2005,SH2006
(IgG性抗体)

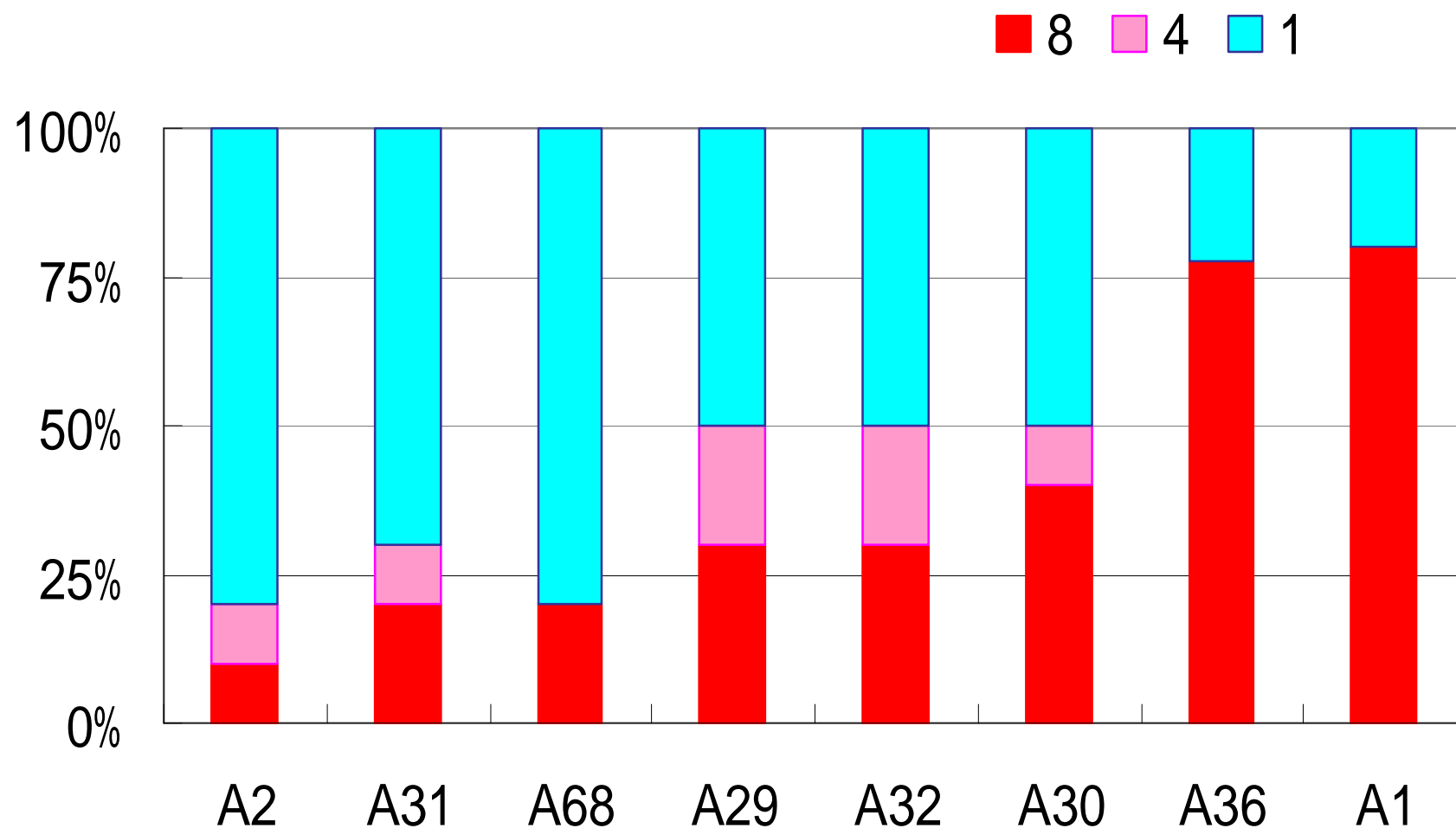
*方法

結果が不一致となった抗原において、single antigenを実施した10施設が決定したスコアの比較(そのばらつきを棒グラフで表現)と、その反応性の差について原因を調査。

singleで検出した抗体特異性 (SH2005: クラス)

完全一致で陽性	A11, A25, A26, A43, A34, A66, A80, B48, B59, B18, B27, B37, B38, B39, B42, B55, B7, B13, B35, B44, B45, B46, B49, B50, B51, B52, B53, B56, B57, B58, B62, B63, B71, B72, B75, B76, B77, B78, Cw2, Cw4, Cw5, Cw6, Cw9, Cw10, Cw15, Cw17, Cw18
陽性と陰性が混在	A2, A31, A68, A29, A32, A30, A36, A1, B64, B81, B47, B73, B41, B60, B61, B8, B67

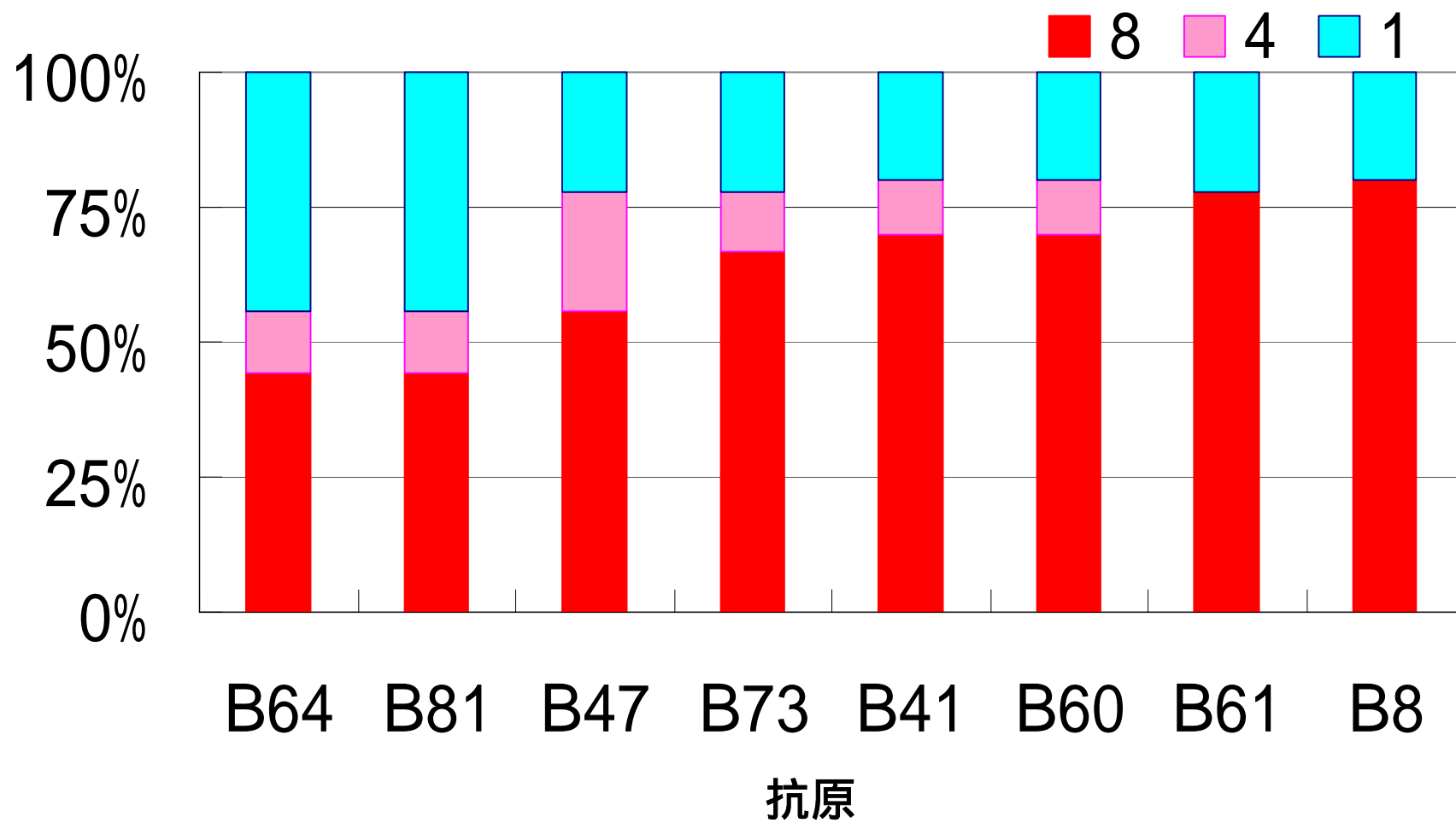
SH2005判定結果比較 (クラス)



抗原

実施施設(10施設)間の抗原別判定スコアのばらつきを棒グラフに表した。

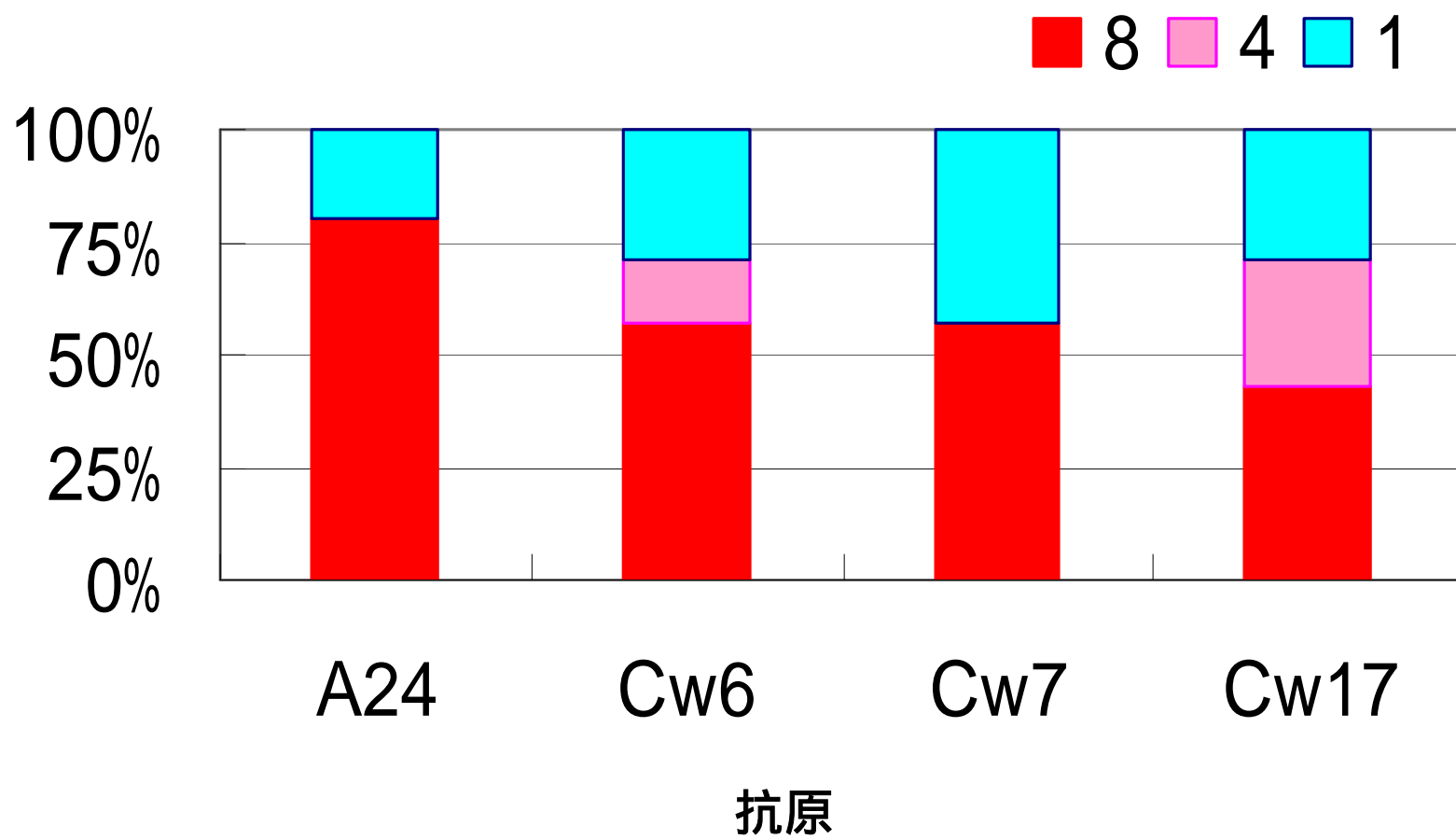
SH2005判定結果比較 (クラス)



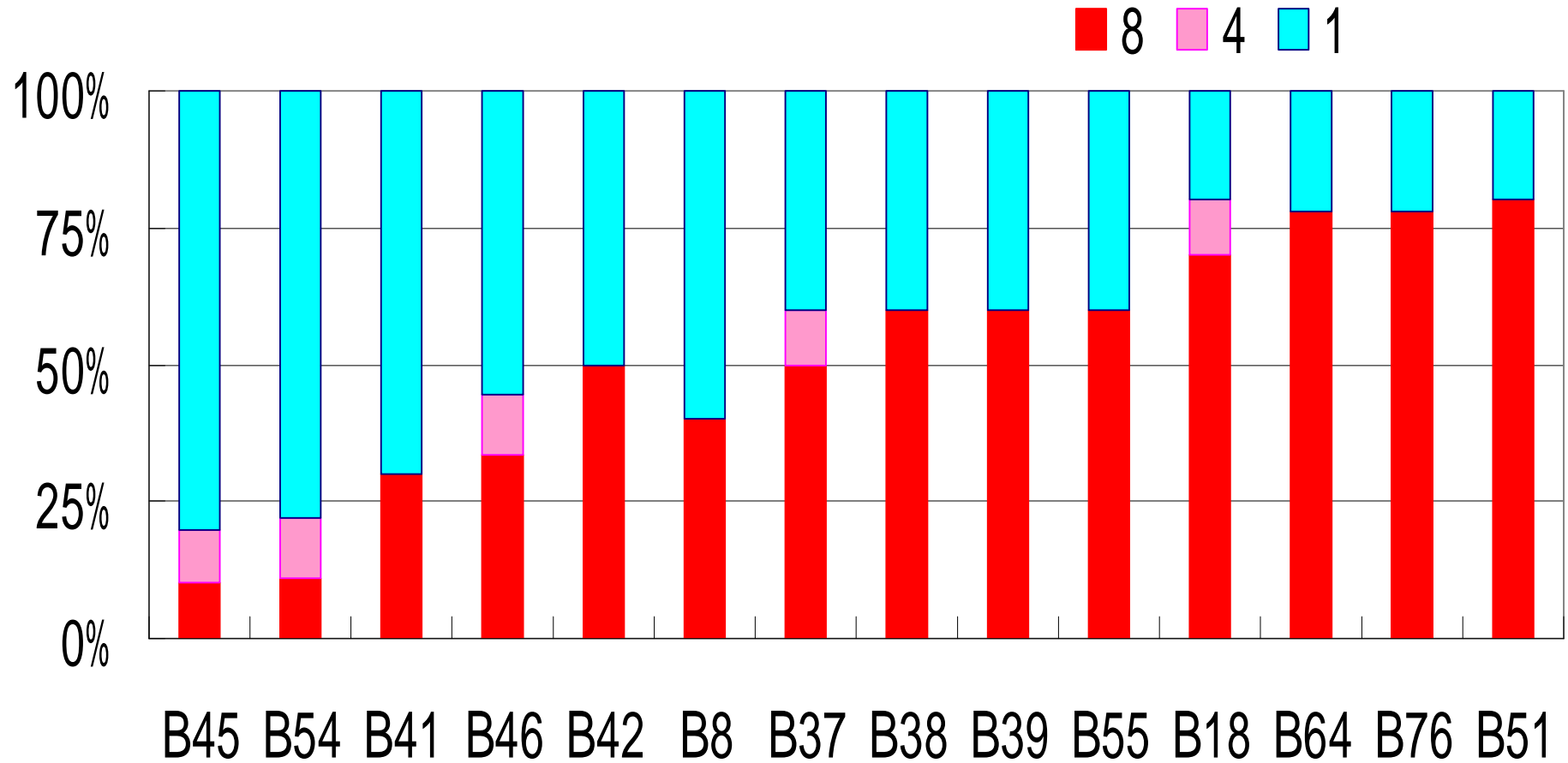
singleで検出した抗体特異性 (SH2006: クラス)

完全一致で 陽性	A1,A2,A3,A11,A26,A30,A31,A33,A25 A29,A32,A34,A36,A43,A66,A68,A69, A74,A80,B49,B50,B56,B62,B63,B73, B75,B58,B71,B77,B78,B35,B52,B53, B57,B72,Cw18
陽性と陰性 が混在	A24,B45,B41,B46,B42,B18,B37,B38, B39,B54,B55,B8,B64,B76,B51,Cw4, Cw6,Cw7,Cw17

SH2006判定結果比較 (クラス)



SH2006判定結果比較 (クラス)

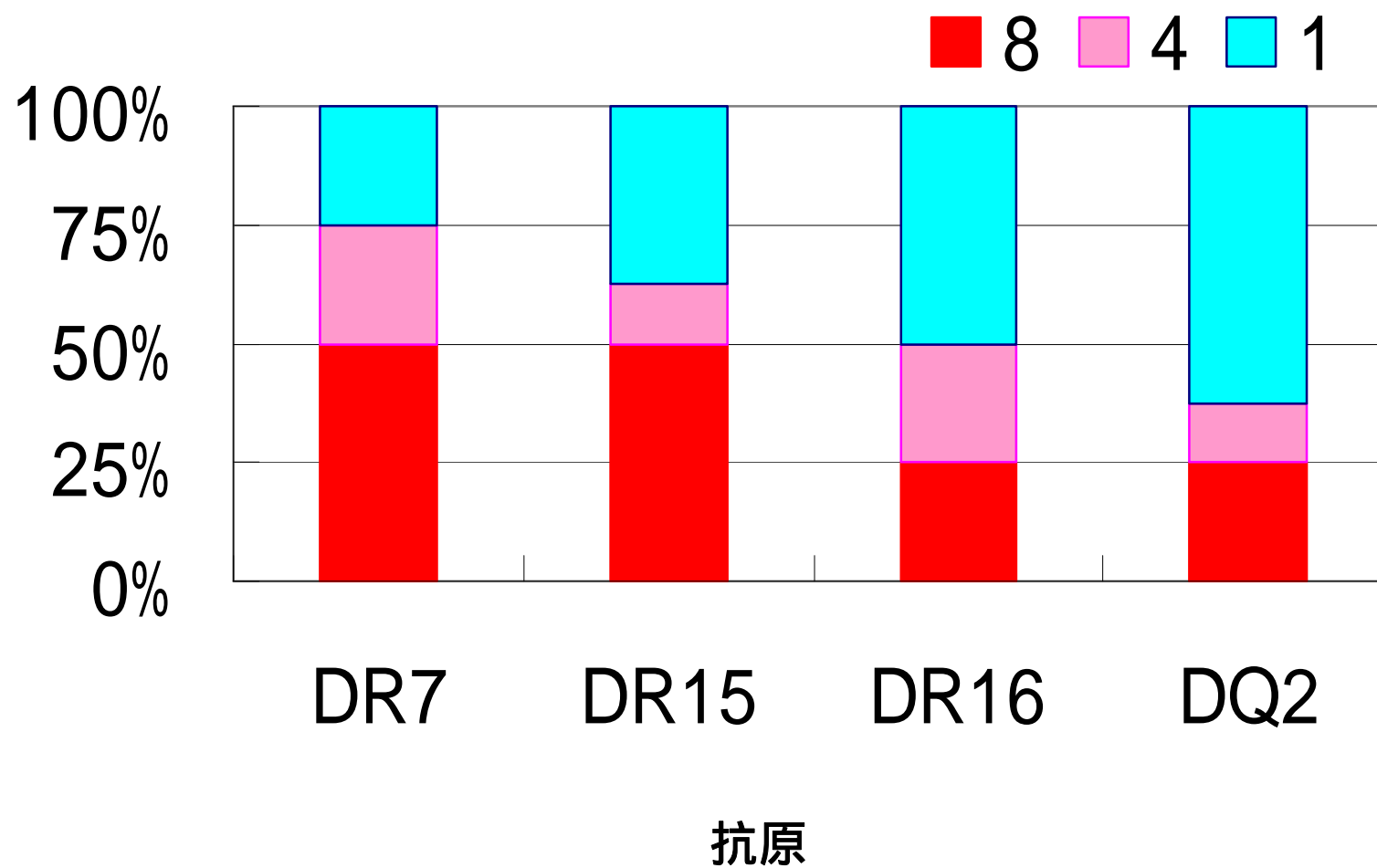


抗原

single で検出した抗体特異性 (SH2006:クラス)

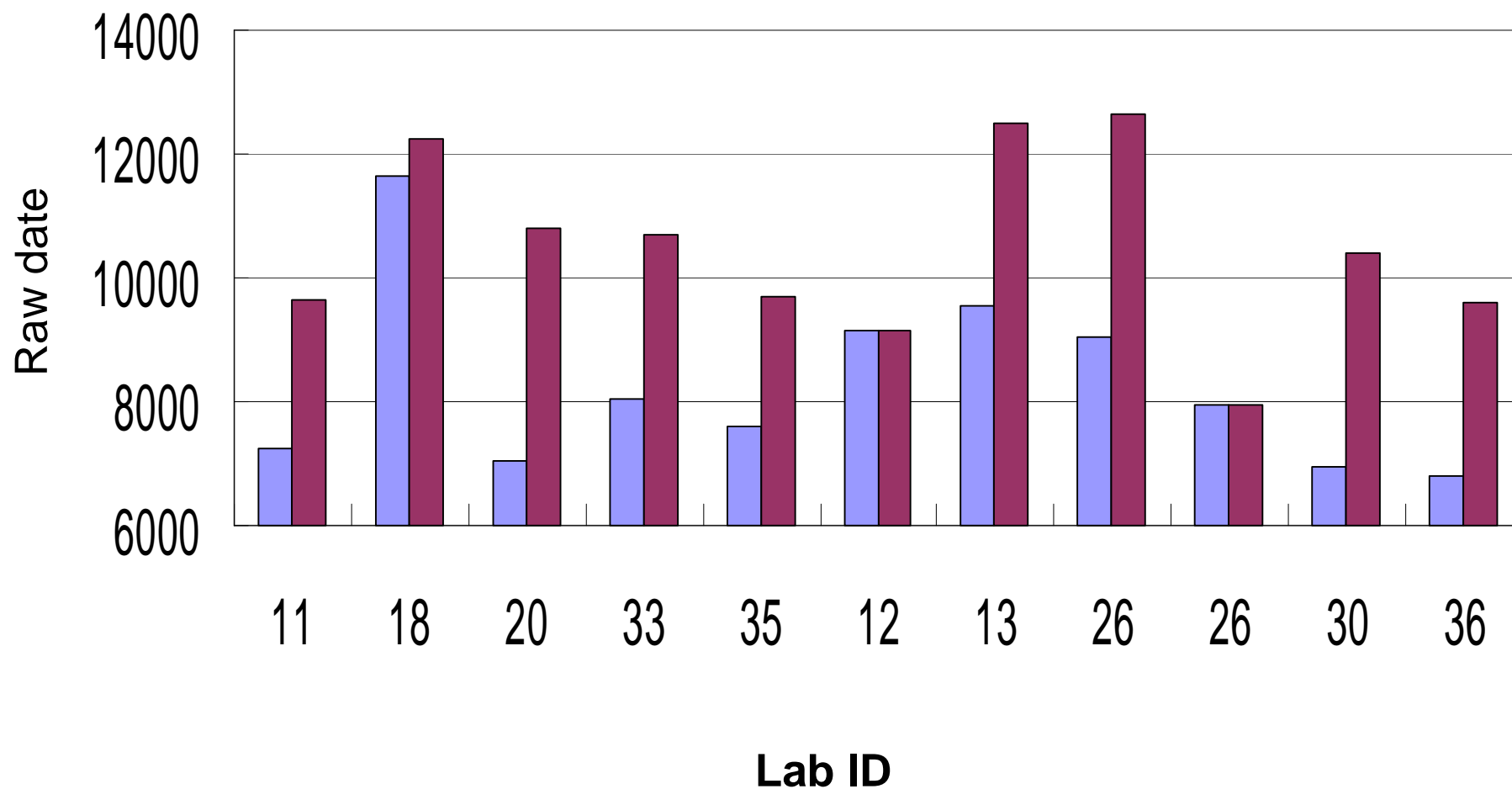
完全一致で陽性	DR11,DR12,DR13,DR14, DR17,DR8,DR52,DQ7
1施設のみが陰性	DR18
陽性と陰性が混在	DR7,DR15,DR16,DQ2

SH2006判定結果比較 (クラス)

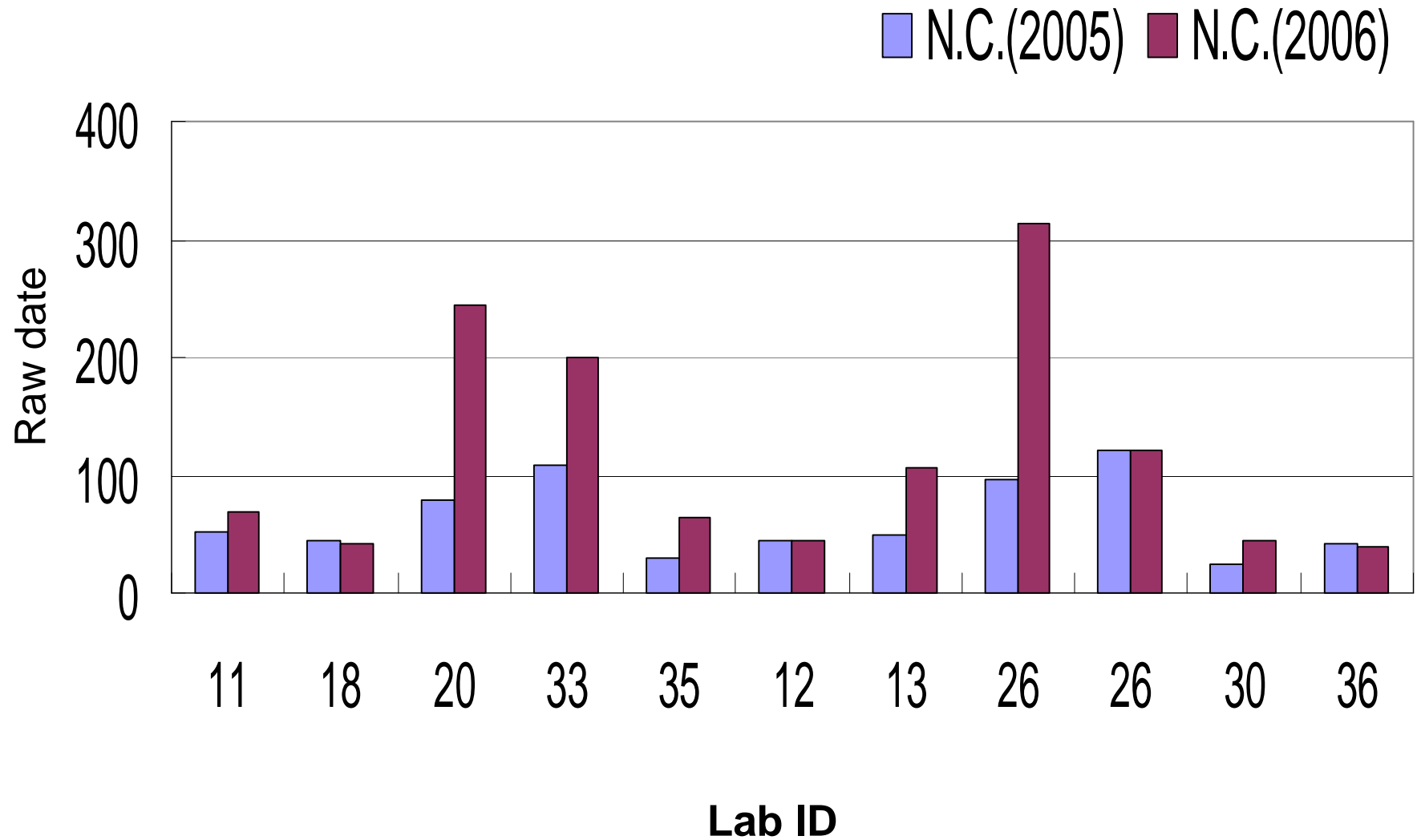


Positive control beadの反応性比較 (クラス)

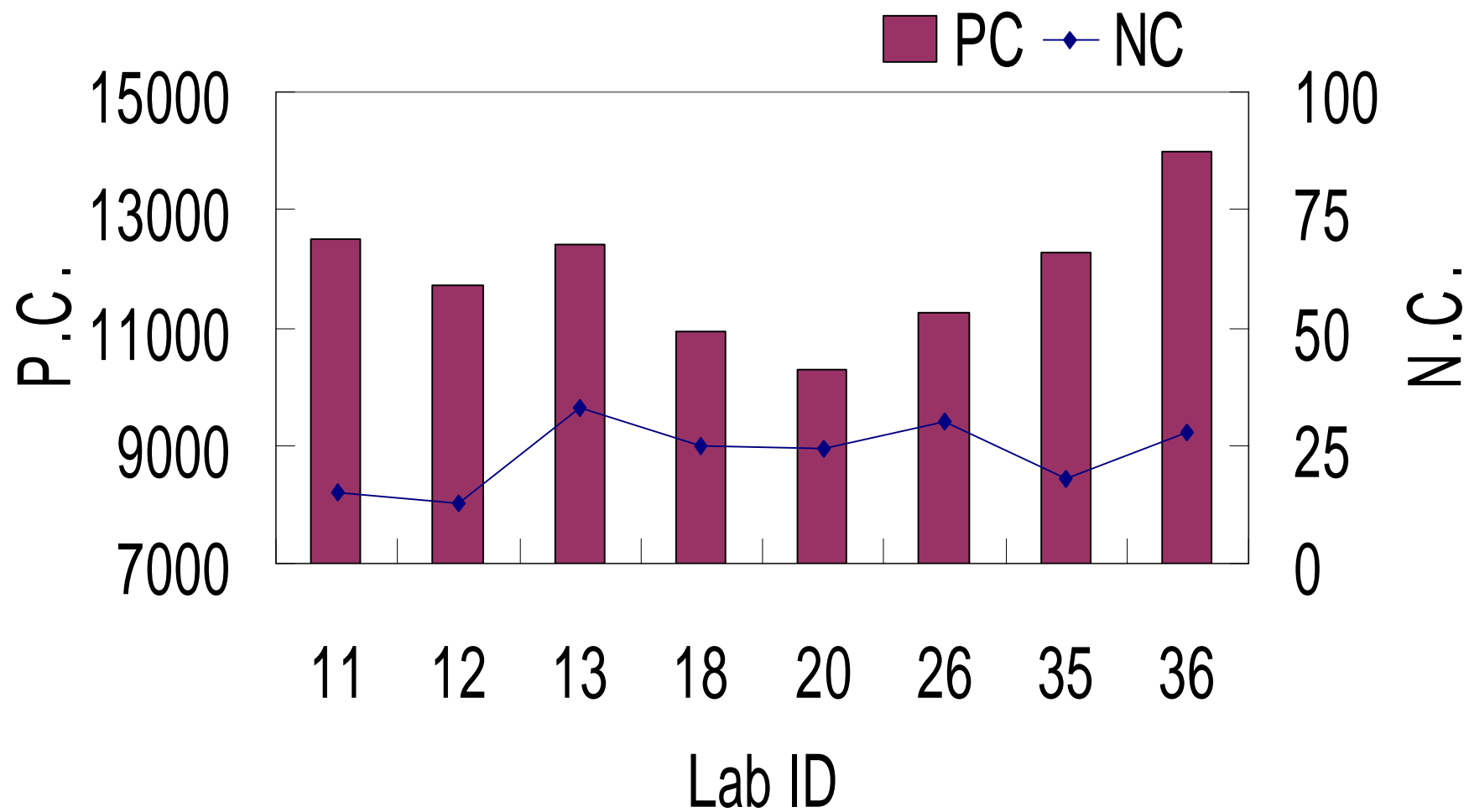
■ P.C.(2005) ■ P.C.(2006)



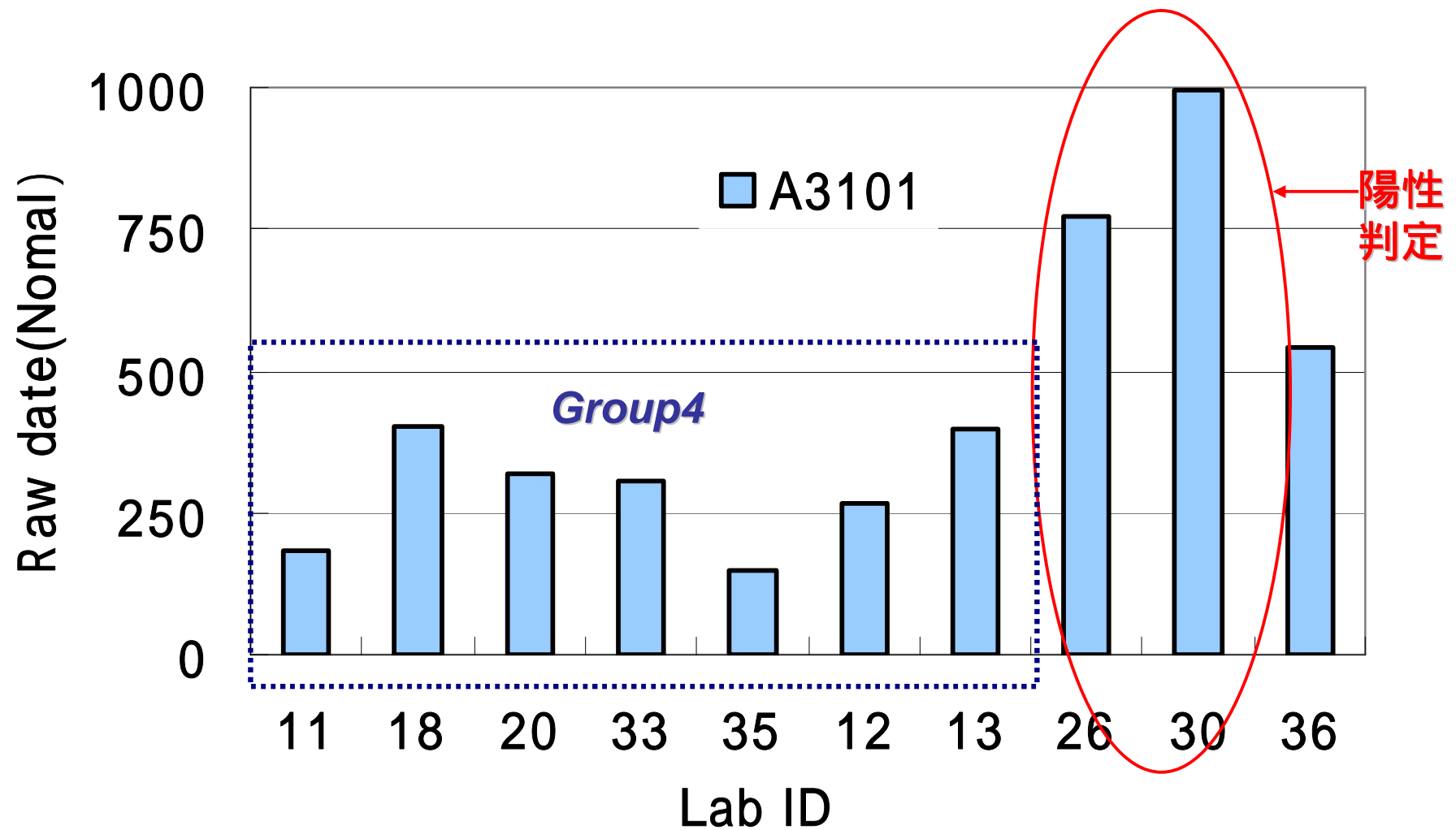
Negative control beadの反応性比較 (クラス)



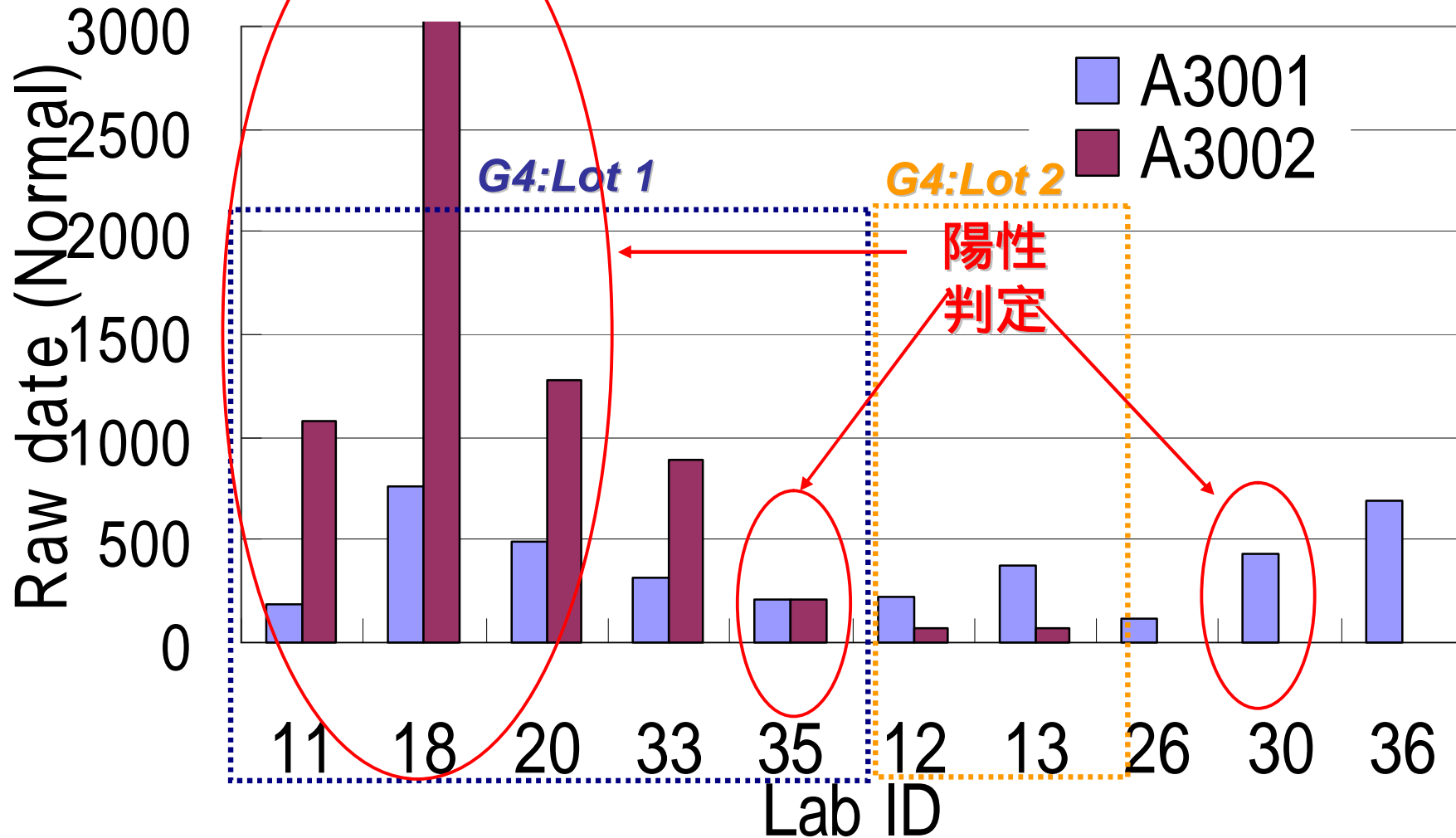
Control beadの反応性 (SH2006:クラス)



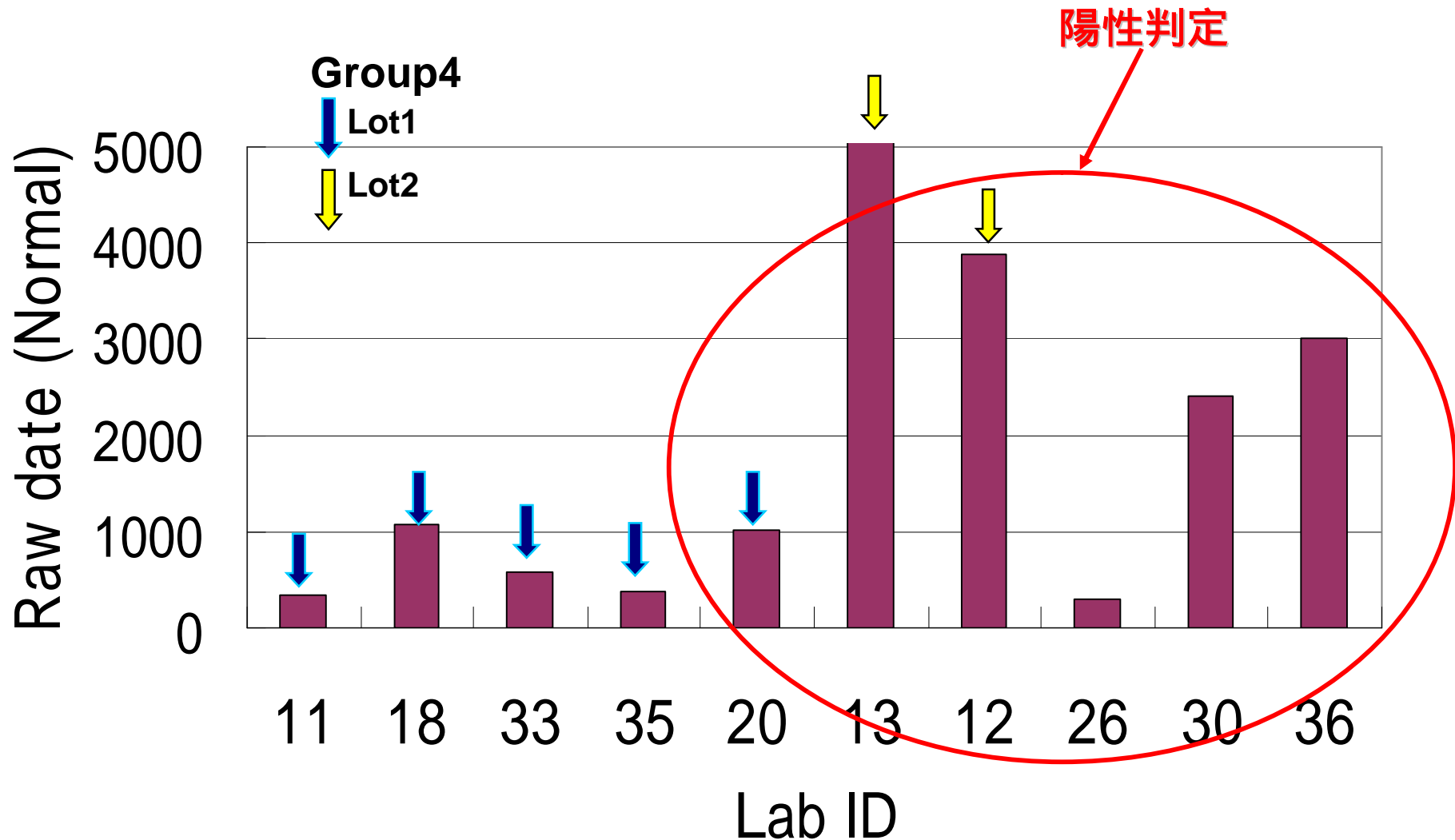
A31抗原(陽性率22.2%)に対する反応性の比較 (SH2005)



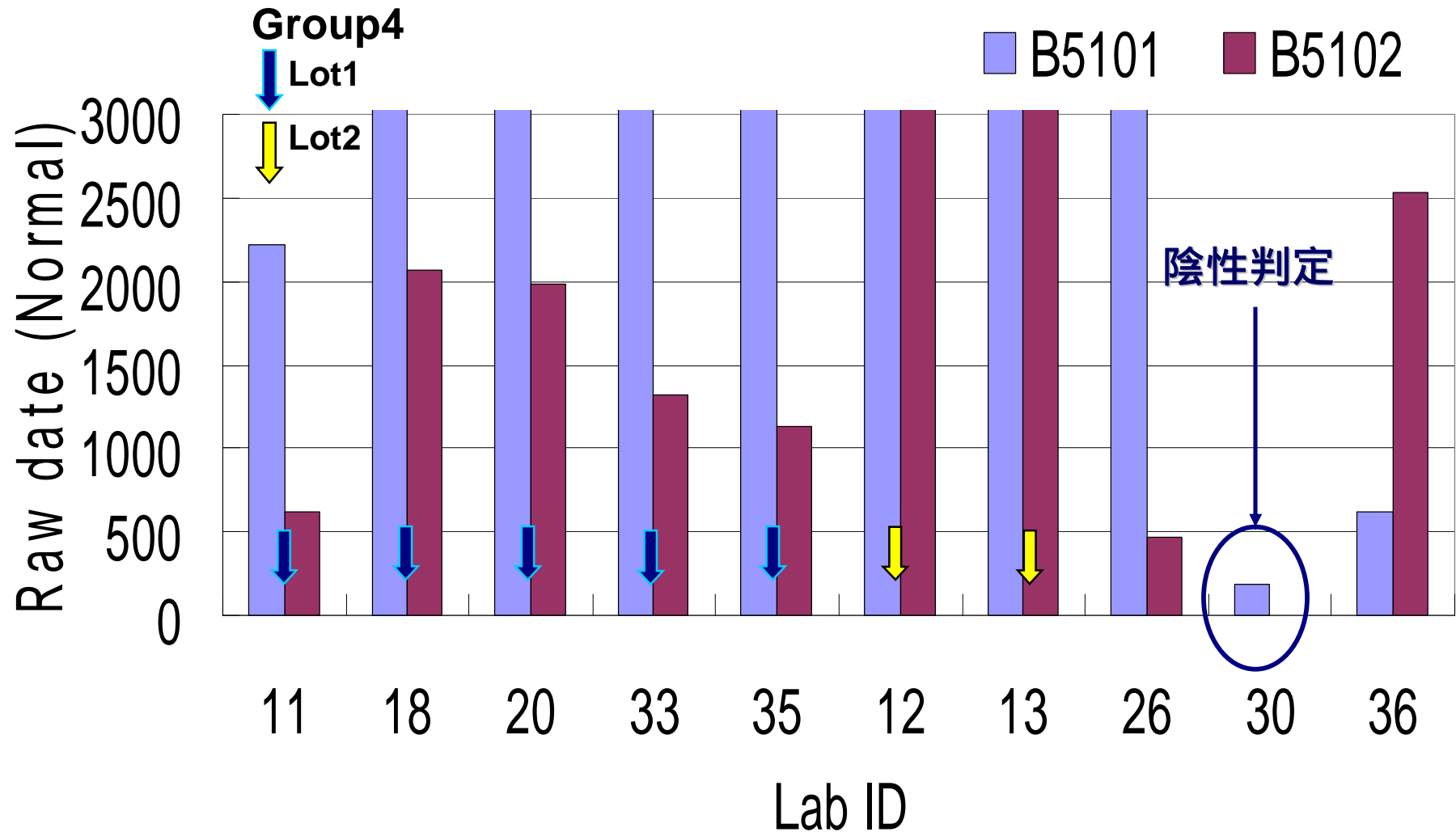
A30抗原 (陽性率44.4%) に対する反応性の比較 (SH2005)



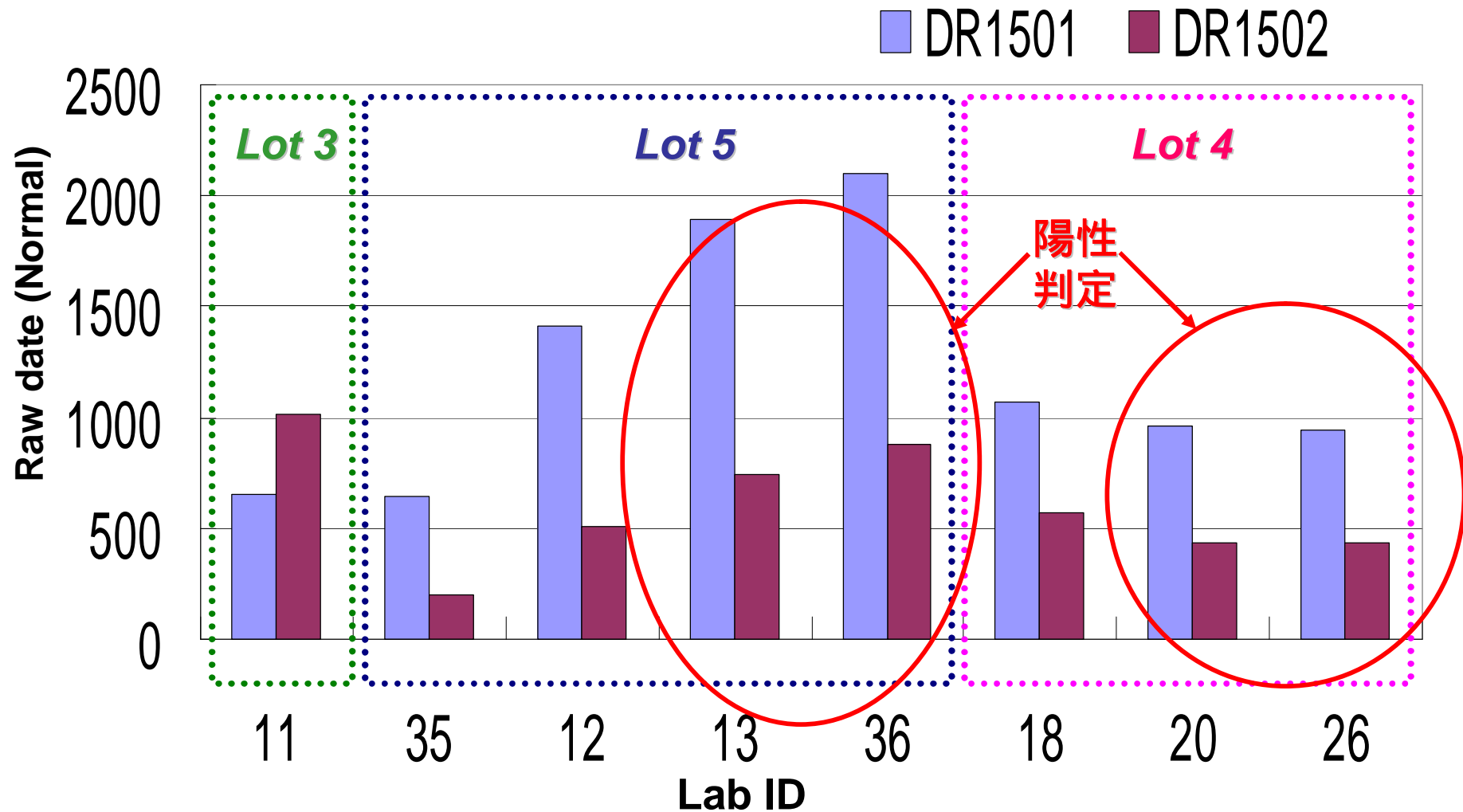
B55抗原 (陽性率60%) に対する反応性比較 (SH2006)



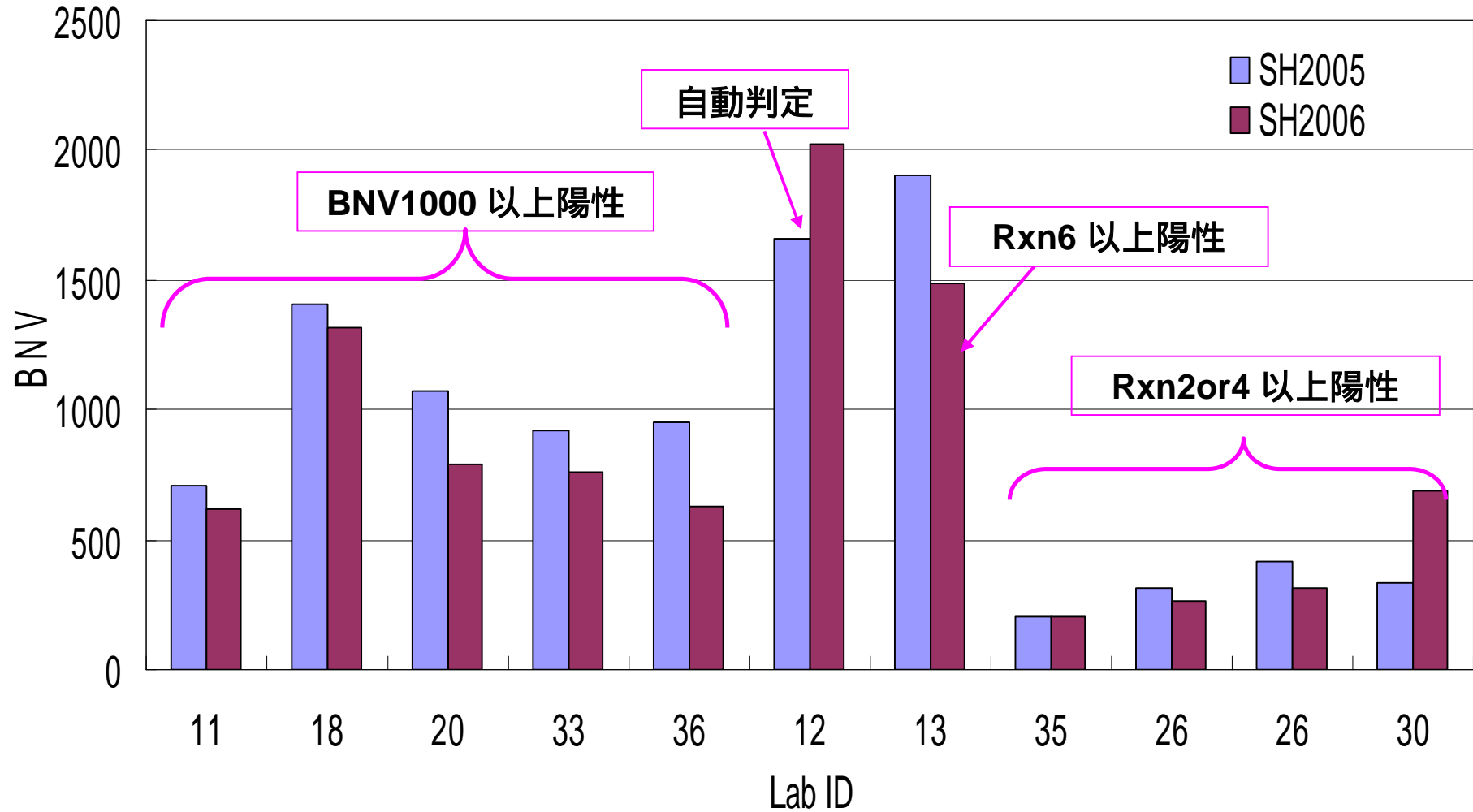
B51抗原 (陽性率80%) に対する反応性比較 (SH2006)



DR15抗原 (57.1%) に対する反応性比較 (SH2006)



判定境界ラインの比較



各Labが陽性と判定したビーズのうち最も低いBNVを比較する。グラフ中のテキストは各施設の陽性判定基準を示す

判定結果が不一致となった主な原因

- Lot間差による反応性の違い
精製細胞の変更
- 施設による反応性の違い
反応条件(サンプリング量等)の変更?
- 判定基準の違い

参加施設によるグループ解析

方法

- 提出されたファイルから得たまとめをメールで各実施施設に送信する。
- その際、反応条件面についてのアンケートに答えてもらう。
- 参加者はデータを受け取ったら、自施設とそれ以外の結果を比較し、特に他と一致しなかった判定結果について考察する。
- 各施設からの考察結果を再度解析担当者に送信し、総合評価とする。

反応条件比較

前処理		反応	温度	サンプリング		反応中の状態	時間	洗浄回数 (buffer量)	
rpm	(分)			検体	bead			一次終了後	二次終了後
10.000	10	プレート	25 (室温)	20 μ L	5 μ L	マイクロミキサーで緩やかにミキシング	一次反応、二次反応ともに30分	3回 (1回目は150 μ L、2、3回目200 μ L)	2回 (200 μ L)
15.000	60	プレート	25 (室温)	5 μ L	1.25 μ L	シェーカーでミキシング		3回 (1回目は150 μ L、2、3回目200 μ L)	2回 (200 μ L)
13.000	10	プレート	25 (室温)	20 μ L	5 μ L	シェーカーでミキシング		3回 (1回目は150 μ L、2、3回目200 μ L)	2回 (200 μ L)
9000g	10	プレート	25 (室温)	20 μ L	5 μ L	シェーカーでミキシング		3回 (100 μ L)	2回 (100 μ L)
15.000	5	プレート	20 (air incubator)	16 μ L	5 μ L	Voltexでミキシング		3回 (200 μ L)	2回 (200 μ L)
15.000	10	プレート	25 (室温)	20 μ L	5 μ L	プレートミキサーで振とう		4回 (200 μ L)	1回 (200 μ L)
11.000	10	チューブ	18 (室温)	20 μ L	5 μ L	Voltexにプレートをセットし、チューブをたててミキシング		3回 (1回目は150 μ L、2、3回目200 μ L)	2回 (200 μ L)
10.000	10	プレート	25 (室温)	20 μ L	5 μ L	Voltexでミキシング		3回 (1回目は150 μ L、2、3回目200 μ L)	2回 (200 μ L)
13.000	30	プレート	25 (室温)	10 μ L	2.5 μ L	シェーカーでミキシング		3回 (200 μ L)	2回 (200 μ L)
13.000	3	チューブ	25 (室温)	20 μ L	5 μ L	Voltexでミキシング		3回 (1000 μ L)	3回 (1000 μ L)
10.000	10	プレート	25 (室温)	20 μ L	5 μ L	Voltexでミキシング		3回 (200 μ L)	2回 (200 μ L)

各施設の判定基準(各施設の回答)

* 当施設は移植関連施設です。解析の結果×4にしましては、すべての解析法で検討した上で総合判定しております。

* 解析の結果がグレーゾーンであった場合は総合的にみて抗体陽性として取り扱う。基本的にはVisual (Baseline)でTopのRaw dataが1000以上であれば抗体陽性と判断し、500～1000の場合はその特異性、交差反応性を考慮して個々に陰性、陽性の判断を行う。

基本的に陽性を×6までにして、それにプラスEピット解析で陽性と判定されたところまでを陽性として報告している。

* Visual (Baseline)で解析、Rxn8,6,4を陽性と判定しています

* 当施設は輸血関連施設であるため、解析の結果がグレーゾーンであった場合はすべて抗体陽性として取り扱う。具体的にはBaselineで判定されたスコア(Rxn値)が2以上であれば抗体陽性と判断しているが、その特異性、交差反応性を考慮して個々に陰性、陽性の判断を行っている。

* Sampleの反応値からネガティブコントロールserumの値を引いた値をみて、1000以上であれば陽性、500～1000までであれば偽陽性。

各施設の判定基準 (各施設の回答)

* 日ごろ臨床検体を扱っていないのと、QCWSでは検体の背景情報がないので、実践的な形で何かを判断することはできないので、基本的にソフトが判定したままを提出しています。

* HLA visualのBaseline(Cutoffはソフトウェアの規定値)で判定。

抗体特異性が明確で、BNV値が1,000以上は陽性。

抗体特異性が不明瞭な場合は、RatioScoring、RawData、許容抗原で特異性の傾向を見極める。

BNV値が1,000弱の場合は、バックグラウンド要素を排除する処理(AdsorbOutなど)で再検査。

* Raw dateが1000以上であれば抗体陽性とし、それ以下の場合はその特異性、交差反応性を考慮して陰性、陽性の判定を行う。ただし、Raw dateが1,000以上(特に1,000付近)であっても、特異性が認められない場合は陰性と判定する。

* バックグラウンドとして使用しているNCのデータにばらつき(?)がみられるため(ワシラムダ社の市販品ですが、ロット間差や小分け凍結保管での変化を感じます)、判定ソフト上のカットオフ値は現在Ratio3.0に設定しています。しかし、Ratio2.0を超える場合やRaw dateが高めの場合は口頭にて説明を加えています。アッセイ時には、過去に測定したデータ既知のサンプルを同時に測定し判定の参考にしています。(この基準はmixedのみ)

陽性判定基準設定のパターン

◆ 明確な抗体特異性を検出している。

- ◆ さらにBNV値 ($> 1,000$) である。

- ◆ BNV値がグレー (500 ~ 1000) の場合は抗体の交差反応性、許容抗原も考慮し個々に判断。

場合によってはAdsorb out処理などによる再検実施。

HLA抗原の交差反応性や出現頻度などの知識が必要

◆ 解析プログラムの自動判定結果

- ◆ Visualで解析判定したRxn(2、4、6)を陽性とする。

- ◆ Visualによるepitope解析の結果を採用する。

自動計算である為に矛盾する結果も存在する

解析結果に関するコメント

* コントロールビーズの値、カットオフの値が施設間でこんなにも差があるとは思わなかった。施設によりHLA抗体検査の目的が違うので、カットオフ値を統一することは難しいと思うが、得られたデータ（蛍光強度）については、施設間の相違はあってはならないと感じた。

* SH2006のように、A*2402(-)、A*2403(+)のケースもあるので、抗原名だけの判定スコアには無理がありますね。

* 今回、当施設の抗体の特異性が、他の施設に比較し若干多いと思われるが、特異性判定時に使用した解析ソフトが旧バージョンであったため、Ratio 5以上を陽性と判定したことによると思われる。

* 各施設における陽性・陰性のカットオフライン(判定の基準値)がさまざまであると思われるので、その基準の統一化が今後の課題ではないでしょうか。

今後の課題(各施設の回答)

- ・全体のレベルを毎年あげていくためにも、問題があった施設への個別フィードバックが必要だと思います。
 - ・試験の実施者が、依頼主(臨床医など)とよくつながることが最も重要だと思います。
- 細部の判定に関しては、重要度合いが目的や状況によって異なると思うので、一律の基準を設けるのが難しいという意味で、依頼主とのコミュニケーションが最も重要だと思います。
- どんな検体で何を目的に検査を出されているのか、また抗原タイピングや各種履歴、クロスマッチ等他の検査結果など、周辺情報もふまえた上で総合的に考えられるのが、理想だと思います。
- ・試験のSOPを守ることはもちろんのこと、機器の日常管理や解析ソフト等への理解を深めることの重要性についても再認識する必要があると思います。

* 輸血関連と移植関連(造血細胞と臓器)での結果の扱いを考慮できないだろうか

* 結果に相違が考えられる原因としては、資料中のコントロールビーズの反応性より、(1)手技による測定結果(得られたそれぞれのビーズの蛍光強度)の違い、資料中の境界ラインの比較より(2)解析時のカットオフの設定の違いが考えられる。(1)については、同一ロットの試薬、同一のサンプル作成プロトコルから得られたそれぞれの施設のデーターを比較してみたい。(2)については、測定済みの同一のデーターファイルを送付し、それぞれの施設で判定し、比較してみたい。

資料のコントロールビーズの反応性比較から、各施設によって、コントロールビーズに差があることから、各施設のそれぞれのビーズに対する蛍光値の比較もしてみたかった。

今後の課題(各施設の回答)

* 移植関連か、輸血関連かによってcut offの設定、抗原の陽性・陰性の判断基準が各施設でことなっていることがわかりました。各施設のデータを見せていただくとほとんど相違ないデータであると思います。しかし、どの施設も実際にどのまでが本当のHLA抗体陽性であるか自信をもってお答えできる方はいないと思います。すべて経験に基づく判断であると思います。ですからcut off 値の正確な判断基準が確定するまでQCWSとしては各施設のデータにほとんど相違がない以上報告形式を×2以上陽性とするなどの一時的な基準を独自に定めてはいかがでしょうか？その結果が真実のHLA抗体陽性であってもなくても統一性を持たせないと統計解析の結果に直接影響してしまうのではないのでしょうか？

真実のHLA抗体陽性であるか否かに関しましてはLABScreenの結果だけでなくFlow PRAの結果とすり合わせることでLABScreenのcut off値が自動的に設定されてくるのではないかと私は思います。本来、HLA抗体を調べているのだから同じ結果にならなくてはいけないと思うのです。各施設で独自の基準値を定めた報告結果をお持ちになり他施設へ患者様が転院された際、混乱を招くと思います。

* Singleの解析についての統一された約束(法則)のようなものが決まってもらえると、報告になやまなくて助かります。Rawdataでtopが1000以上でもthirdが500に届いてなく、×6のデータたちが500以下ばかりでも全て報告すべきか？何に基づいてどこまで報告対象にするか。(データの修正の基準について)

Singleの解析についての統一された約束(法則)のようなものが決まってなく、また現在の当院の運用の場合、検査者の主観の判断になりかねず、とはいえ、一般業務で数人で検査を担当するにあたり仕事を教える際、判断基準が定まっていないと仕事として成り立たないと思います。

今後の課題

- **アッセイにおける技術的レベルの向上**
 - * 同一サンプル同一ロットから得られる蛍光強度の施設間差をなくす。
 - * 判定結果の解釈に必要な知識やデータの蓄積を得る。
- **判定基準の統一化**
 - 検査目的が違う施設間での完全一致は困難。
 - しかし最低限のルールは必要？

今後のQCWS解析に関する提案

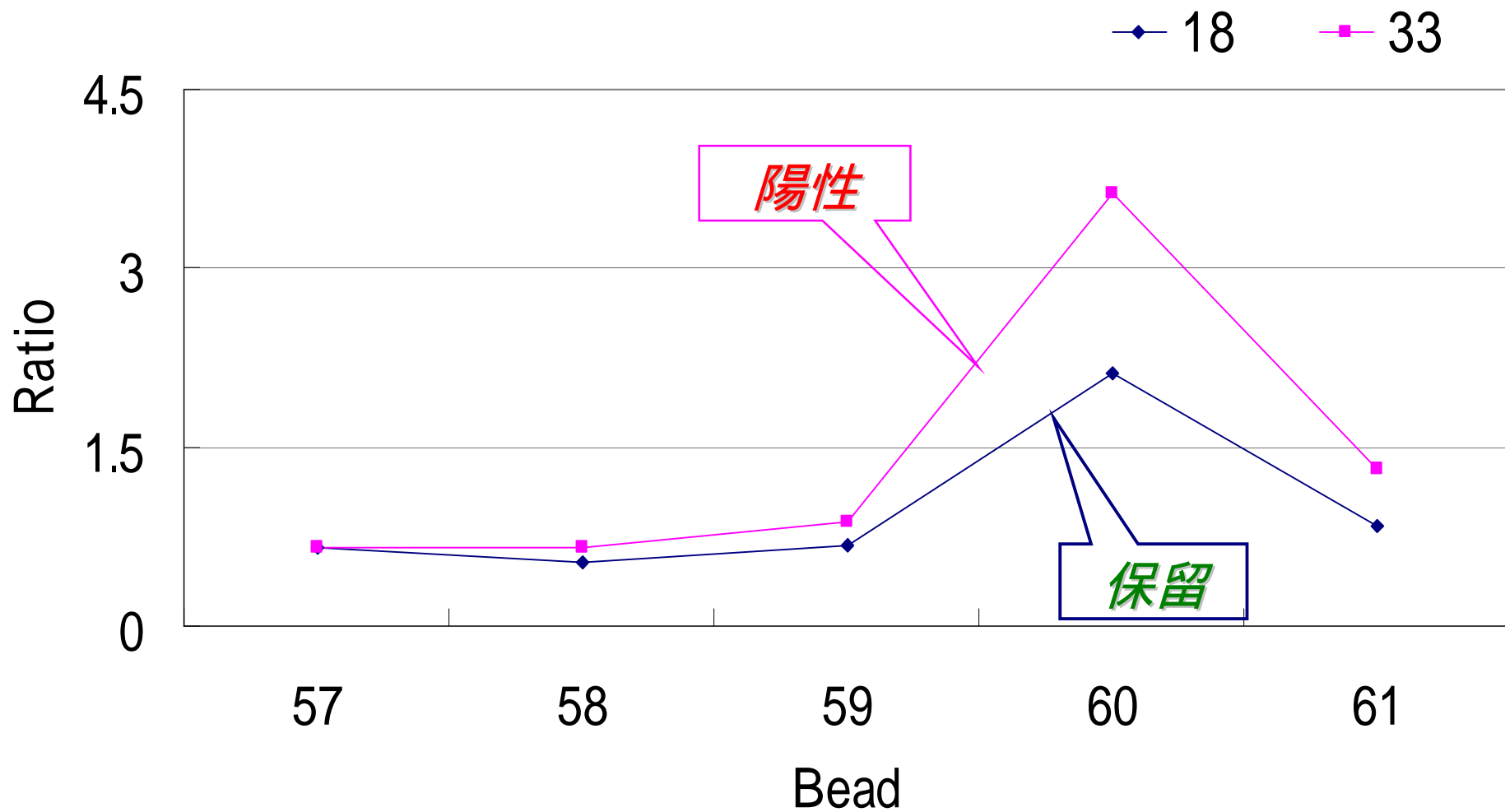
- LABScreenでの判定基準を決めた上で抗原別判定結果を決定し、Flow PRA等の他法と結果の比較をする。
- 測定済みのデータファイルを他施設に送信し、判定の比較を行う。
- 実施施設が輸血関連か、移植関連かなど、施設の事情を考慮した解析を行う。

IgM性抗体の検出について

抗体の有無結果比較 (IgM)

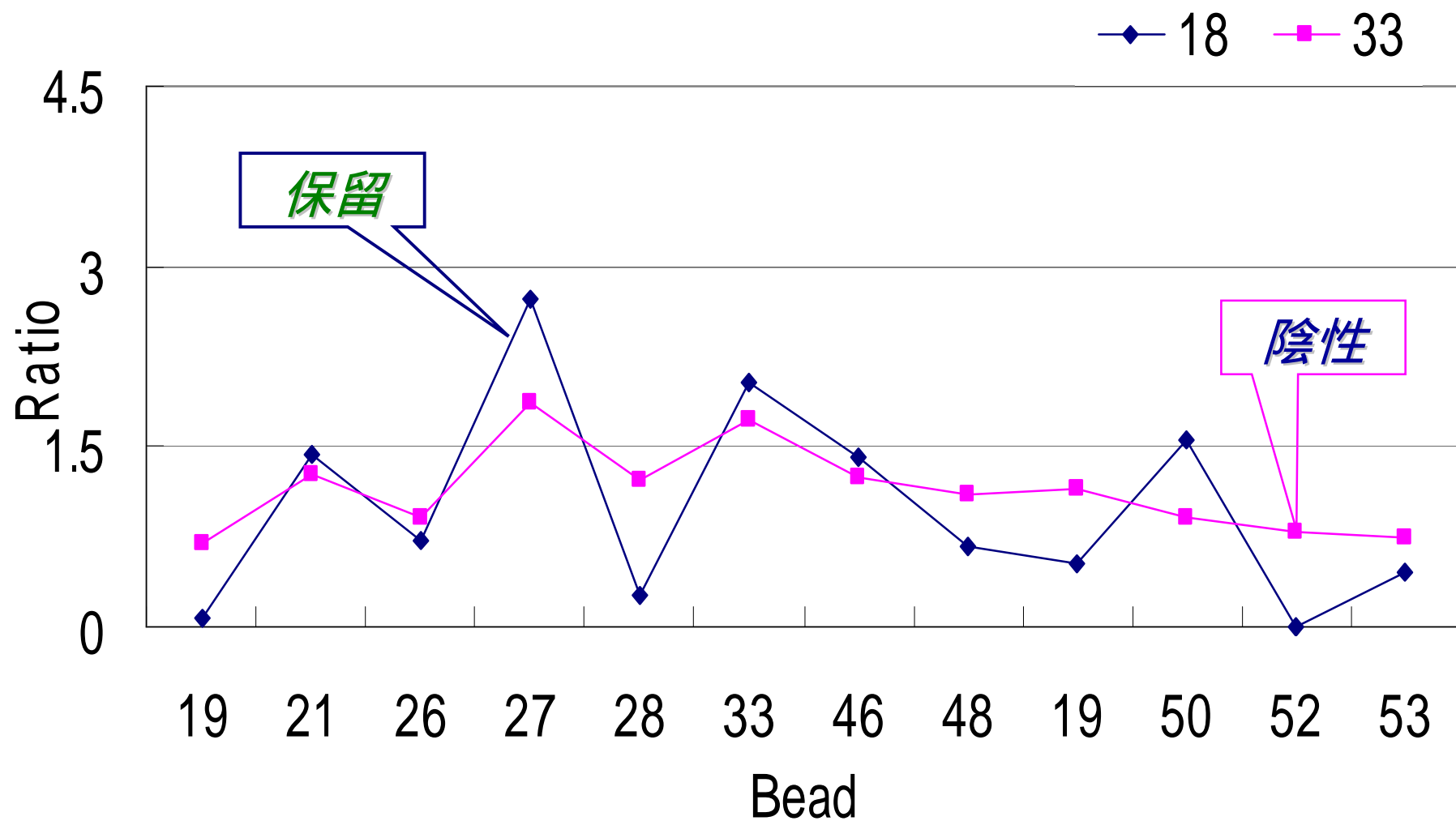
Lab ID	クラス	2001	2002	2003	2004	2005	2006
20S018		8	8	1	4	4	4
		4	1	1	1	1	1
20S020		8	8	1	1	1	1
		8	1	1	8	1	1
20S033		8	8	1	1	1	1
		8	1	1	1	1	1

SH2001反応性比較 (Mixクラス 1 Lot14)



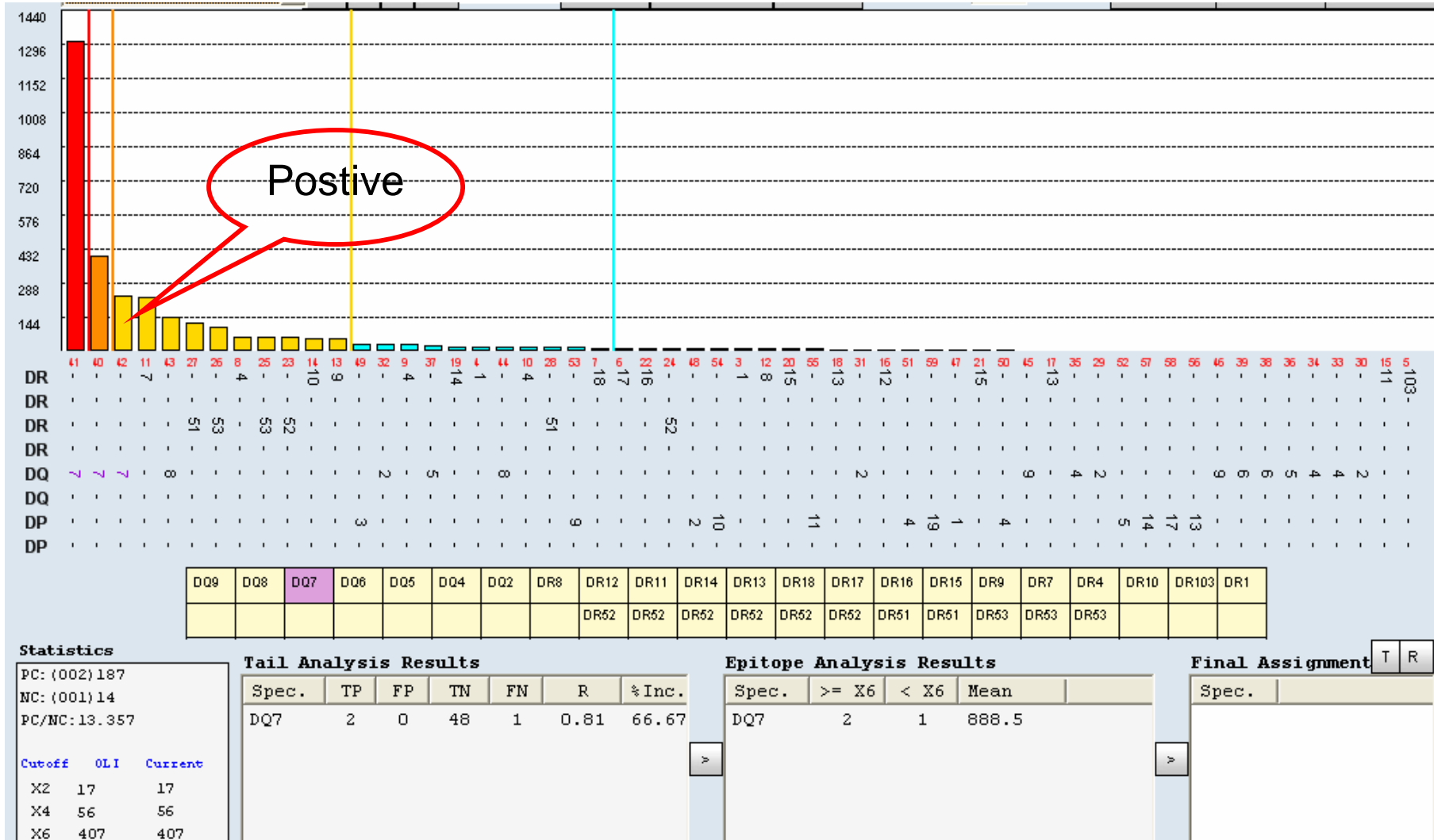
Mixedを実施した20S018、20S033寮施設のRatio比較。グラフ中のテキストが最終判定結果

SH2004反応性比較 (Mixクラス :Lot14)



Mixedを実施した20S018、20S033寮施設のRatio比較。グラフ中のテキストが最終判定結果

SH2004反応性 (single antigen:Lot5-IgM)



陽性判定とした20S020のHLA Visualでの反応グラフ

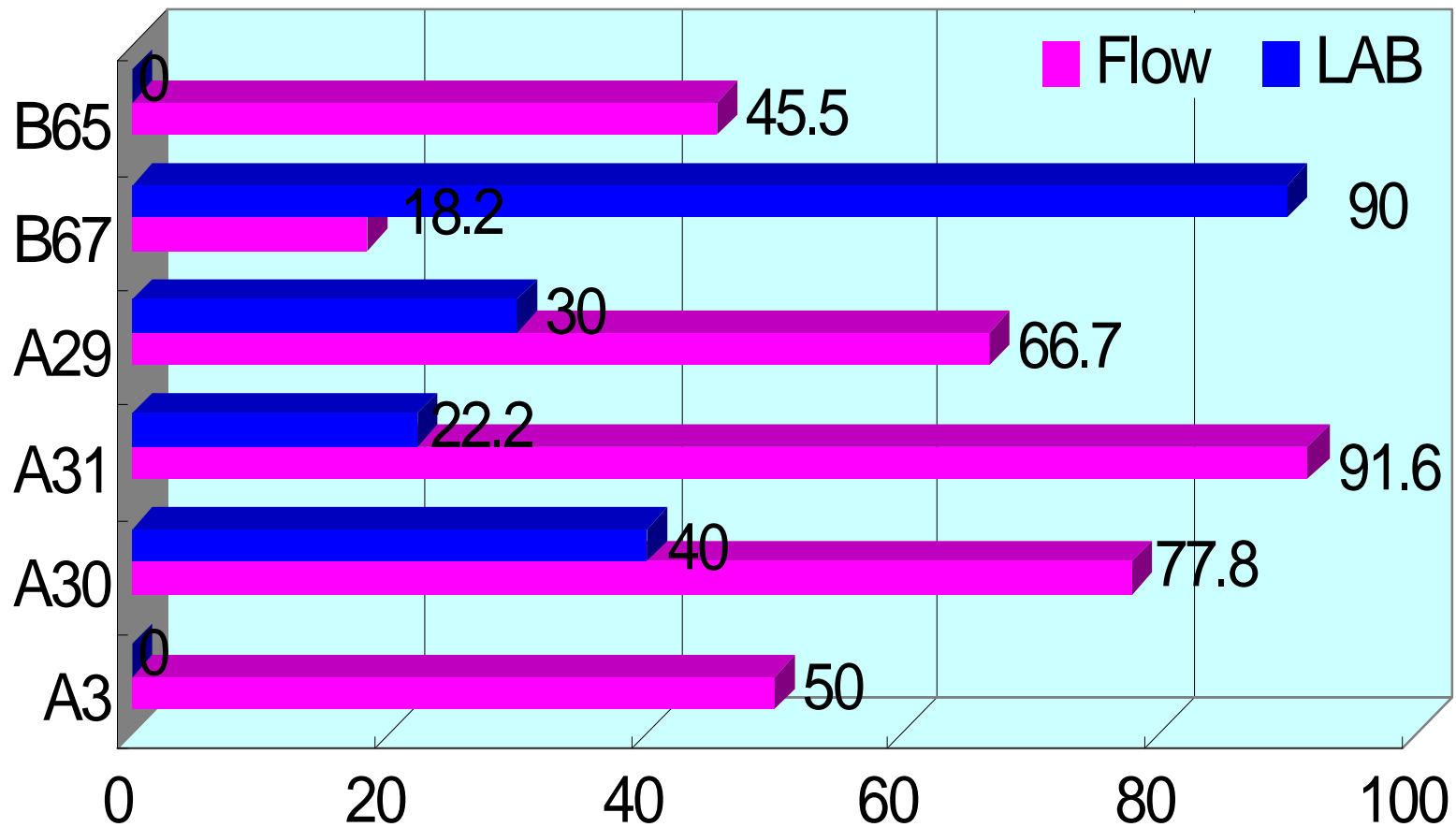
IgM性抗体の検出についてのまとめ

- 反応性の不一致
検体のローカスによる反応性の差異
使用する二次抗体に原因?
- 今後の課題
実施施設を増やして検討する

別法との比較

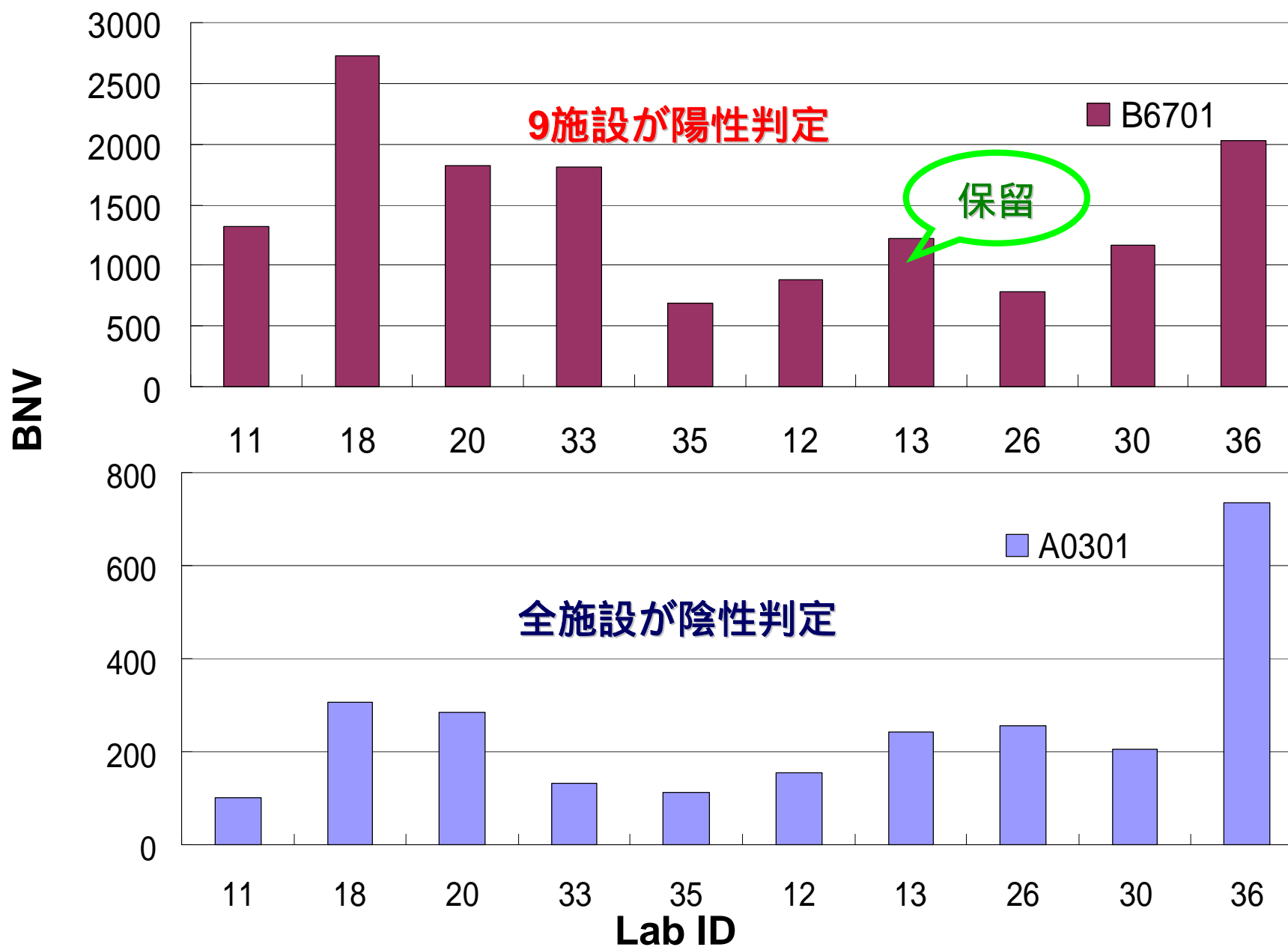
今回QCWSにおいて実施された他の方法のうち、蛍光ビーズを用いた方法としてFlow PRAとの結果比較を行う

FlowとLAB判定結果比較 (S H 2005)

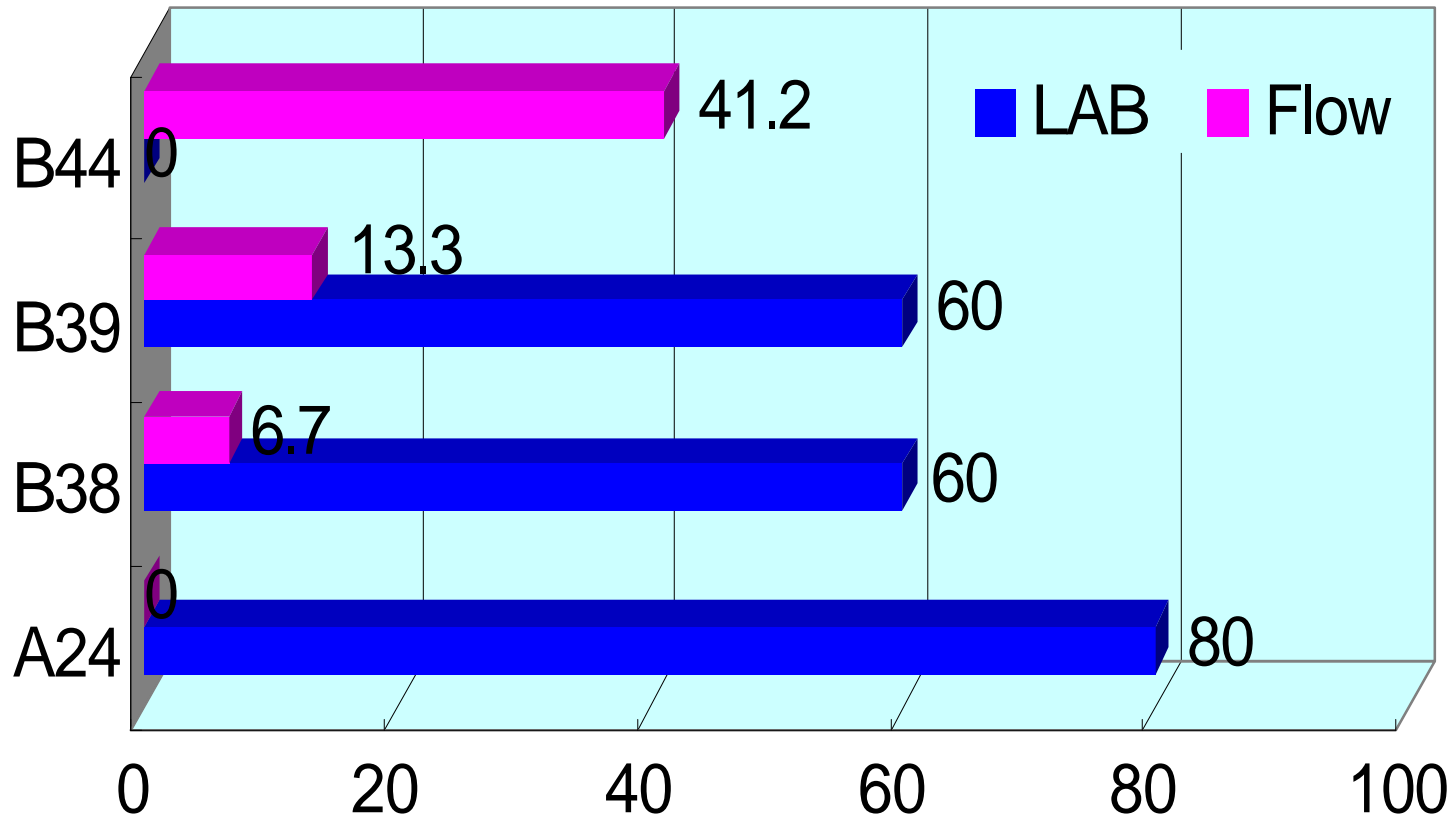


LAB,Flowそれぞれの実施施設の抗原別陽性率を比較し、大きく乖離した抗原をグラフに表した。

A3抗原、B67抗原に対する反応性 (SH2005)



FlowとLAB判定結果比較 (S H 2006)



LAB,Flowそれぞれの実施施設の抗原別陽性率を比較し、大きく乖離した抗原をグラフに表した。

B44,A24抗原に対する反応性 (SH2006)

