

Q&A No.13

今回のテーマ：

測定系確立における抗体の特異性の評価方法について

質問 1：

弊社では培養細胞について表面抗原解析、細胞内抗原解析を実施しております。購入した抗体の特異性の評価についてよい示し方がないか検討しております。メーカーの抗体の仕様書に HCDM (<http://www.hcdm.org/>) のワークショップ番号が記載されているのですが、メーカーに問い合わせても、どのような内容を評価しているのか明らかにしていただけませんでした。

HCDM ワークショップでの評価内容を把握されていらっしゃるれば、参照先等ご教示いただけませんか。

参考までにワークショップ番号が表記されている抗体の仕様書を添付します。

回答のための質問内容の確認：

- ・「抗体の特異性の評価についてよい示し方」

実際にどのような点にお困りでしょうか。もう少し具体的にお願い致します。

- ・抗体の反応特異性について？

通常はもと文献があると思いますので、それを参考にし、さらに自施設での細胞・組織パネルにおける反応性を確認いたします。

クローンの変更は、パネルでの反応性と力価のチェック、Isotype が異なれば非特異反応の程度のチェックも実施します。

- ・細胞を評価したデータの管理として、試験に使用した抗体をどのように管理したら良いか？

抗体は CD 番号が与えられた clone を利用し、製造メーカーが製品管理した抗体を購入している場合には、購入日、保存方法、Lot No、貴社独自の抗体パネルでの反応性の確認、力価チェックなどが考えられますが、これ以外をお考えなのでしょうか。

- ・HCDM ワークショップを参考にするだけでは不十分でしょうか？

ワークショップでは抗原の管理であり、抗体は付随的で抗原を認識する対応抗体の認定と考えら

れます。リファレンス抗体があればパネルによる反応性の比較、エピトープの異同などであり、逆に抗体から発現組織・細胞の同定（現在は遺伝子解析からも可能）を行っているものと理解しています。

添付頂きました CD90 Thy-1 抗原については CD 抗原ハンドブックなどに検証データのもと文献が多数記載されていますが、参考となる文献はありませんでしょうか。

以上のように、メーカーが保証するのは、CD 抗原に対する反応性と力価と考えられます。メーカーやクローン、標識抗体の選択は使用者の管理下にあります。

浮遊系の培養細胞の評価であれば、精製抗体を用いた間接法が適当であると考えられますが、染色方法は、どのようにされていますでしょうか。

また、標識抗体の使用は標識色素・標識操作・精製処理により未標識の精製抗体と反応性が若干異なる可能性があるため、できれば精製抗体との反応性の比較が望まれます。

ご質問の趣旨の理解のために申し訳ありませんが、もう少し詳しい情報をお願い致します。

質問 2（趣旨説明）：

弊社では培養細胞について表面抗原解析、細胞内抗原解析を実施しております。

FCM の測定方法について、各種細胞、抗体を用いて独自に試験系を確立しており、各試験系について分析法バリデーションを実施し、分析法の妥当性を示す必要がございます。一般的なところで以下についてご教示いただけますと幸いです。

FCM の分析法バリデーション評価項目のうち、（抗体の）特異性を示す項目があるのですが、参考にした以下の文献の記載に、HCDM ワークショップか、論文に記載されていることで示すことができるとありました。

Validation of Cell-based Fluorescence Assays: Practice Guidelines from the ICSH and ICCS—Part V – Assay Performance Criteria : Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 84B:315–323 (2013)

メーカーが保証するのは、CD 抗原に対する反応性と力価という点は理解できます。メーカーやワークショップで、反応性の、非特異的な認識についてどこまで評価されているかについて、教えていただきたかったということです。

抗原の特異性、特に、非特異的な認識についても評価されているのであれば、

「ワークショップで評価された抗体であることから、抗体の特異性、非特異性について評価されて

いる」とし、抗体の抗原に対する特異性を評価できると考えた次第です（自社での実証試験の実施は別として）。

繰り返しになりますが、「HCDM ワークショップ で評価されたクローンの抗原に対する特異性は（非特異的な認識がないことも含めて）証明されている」といってよいか、ご存知でしたらご教示いただけますでしょうか。

また、FCM の分析法バリデーションを実施するにあたり、文献等も様々ですのでどれに従ってバリデーションの評価項目や評価基準等を設定すべきか困っております。参考となるガイドライン、文献等ございましたらご教示いただけますと幸いです。

回答 1

1. 抗体評価試験方法について

参考になるガイドラインや文献につきましては、現時点ではもっておりませんので、調査してみます。（回答2の文献、資料を参考にしてください）

2. メーカーやワークショップで、反応性の、非特異的な認識についてどこまで評価されているか？

特異性については種々実験系で評価されています。非特異的な認識については、交差反応性の有無として、評価されています。

抗体クローン開発者の文献、またHCDMワークショップに認証されている抗体クローンであれば、HCDMワークショップでの評価試験により特異性が認証されていることとなります。

抗体メーカーでは、製品ロット毎に品質試験を実施し合格したものを販売しており、ご依頼に応じて品質保証書（Certificate of Analysis）を発行しています。

回答 2

1. 「HCDM ワークショップ で評価されたクローンの抗原に対する特異性は（非特異的な認識がないことも含めて）証明されている」といってよいか？

断言はできないものの、CD 番号を規定している HLDA ワークショップ（ワークショップ名は HLDA となります）は現状最も信頼されているワークショップかと思っておりますので、通常こちらで規定された抗体の反応性については、評価・証明されたクローンであるとの認識が一般的である

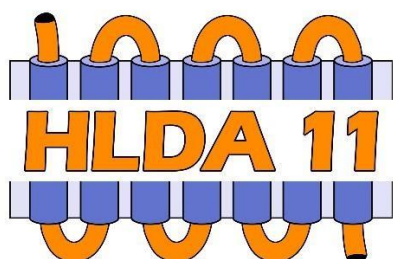
と考えます。現在、第 11 回ワークショップのための抗体登録が進められておりますので、HCDM の HP に掲載されている HLDA11 のプロトコル文書を添付いたします。

ワークショップで確認される方法や確認する細胞群等が記載されております。数多くの cell line での反応性が確認されており、非特異反応に関しても一定の評価はなされていると考えます。

また、送付いただいた抗体（クローン：5E10）についての評価内容は第 5 回ワークショップについての書籍（Leucocyte Typing V, Oxford university Press ; 2 冊構成となっています）に抗体番号 M07 として掲載されておりますので、そちらをご参照いただければと思います。

2. FCM 分析法のバリデーションについて

現在広く認知されているのは記載されていた 2013 年の Clinical cytometry に掲載されたガイドラインが該当するかと思います。他の動向としましては、米国 CLSI にて新たなガイドライン（H62 : Validation of Assays Performed by FlowCytometry）が策定中です。昨年ドラフト版が作成され、パブリックコメント受付を終了しており、今年に発行される予定と聞いておりますが、2020 年 8 月 28 日の時点では CLSI の HP でも確認できませんでしたので、発行までもう少しかかるかも知れません。



HLDA11 WORKSHOP PROTOCOL

HLDA Workshops are *wet* workshops based on an international exchange and blind evaluation of mAbs, submitted by numerous academic laboratories and/or companies

The main goal has consistently been to identify mAbs reacting with a common Ag.

The basic strategy is to assess a given mAb's reactivity with a large number of different cells, followed by statistical analysis of the resulting expression data and further examine of the biochemical nature and molecular mass of the target antigen and the reactivity with transfected cells.

HLDA11

Step 1. MAbs are submitted by academic groups and/or companies and one panel of mAbs against

G protein-coupled receptor. (see attached list of potential new CDs).

Amount of antibody: 500 micrograms (PE-labeled) for FACS analysis; and 100 micrograms (unlabeled) for IP and IHC

Submission dead-line June 2019

Send us the HLDA11 submission form before sending antibodies (pengel@ub.edu).

Step 2. The organizing laboratory aliquots and distributes the mAbs among the participating laboratories

Step 3. Participating laboratories perform reactivity blind studies with the mAbs included in the panel using 12-color flow cytometry.

- Primary blood primary cells (all major leukocytes and lymphocyte subsets) two tubes of 8color flow cytometry. Other cells (platelets, erythrocytes)

Tube 1. Innate leukocytes (markers: CD16, CD56, CD14, CD11c, HLA-DR; CD123, and CD3, CD19, CD34, DAPI)

Tube 2. Lymphocyte subsets. (markers: CD45, CD3, CD19, TCRg/d, CD4, CD8, IgM, IgD, CD45RA, CD27, CXCR5, CD25)

A minimum of 12 samples (4 in 4 different labs)

- Collection malignant cells (leukemia's, lymphomas and myeloma cells) to be determined

A panel of a minimum of 20 leukocyte cell lines and 5 non-hematopoietic cell lines. Suggested list to discuss: T cell lines: Jurkat, HUT78, Molt4; B cell lines: REH1, RAJI, DAUDI, SUDHL10, UPN2, U266, RPMI8226; Myeloid cell lines: HL60, THP-1, KG1, EM2, K562; NK cell lines: YT; Non-hematopoietic: COLO205 (colon), A549 (lung), AN3CA (uterus), HEK (kidney), HELA (adenocarcinoma), MGHU3 (bladder carcinoma), MCF7 (breast)

This approach is only possible as a combined effort by a large group of laboratories

Dead-line December 2019

Step 4. Statistical analysis clustering (code brake)

- Clustering within the panel and with the data obtained by the CDMaps project.

Step 5. Biochemical characterization of the target molecules using immunoprecipitation (data are used to further validate the clustering analysis). Only mAbs against potential new CDs.

Step 6: Reactivity with transfected cells. The cross-reactivity of the Abs with proteins encoded by a common gene family.

Step 7: Reactivity with Malignant cells (leukemias)

A cohort of about 150-200 CLL all well characterized for several surface markers (including expression, activation state of the integrins VLA-4 VLA-3 and VLA-5) and molecular markers (including mutations of TP53, NOTCH1 BIRC3 and SF3B1)

Step 7. CD designation. The designation of new CDs requires submission to the workshop of at least two independent mAbs that recognize the same molecule and present an identical pattern of reactivity

Step 8. All of the generated data and experiments performed with the submitted mAbs are presented at the HLDA Conference, probably in conjunction with an international Immunology meeting.