

---

QCWS 参考プロトコル

# HLA 抗体検査 (ICFA)

---

平成 29 年度版

作成者

日本組織適合性学会 認定制度委員会 ワーキンググループ

抗 HLA 抗体 WG

---

## 改訂履歴

版数	改訂日	改訂理由	改訂内容	改訂責任者
	施行日			
2				

## 目 次

1. 検査の準備.....	1
1. 1 検査機器の準備 検体処理.....	1
1. 2 検体の準備.....	1
1. 3 検査法の原理.....	2
1. 4 検査手順.....	3
2. 検査時の注意点.....	6
2. 1 検体の準備.....	6
2. 2 検体レイアウト.....	6
2. 3 操作時の注意点.....	7
[参考文献] .....	7

---

## 1. 検査の準備

ICFA 法については市販キット (WAKFlow® HLA 抗体クラス I (ICFA) および WAKFlow® HLA 抗体クラス I & II (ICFA) : 湧永製薬) を用いることとし、検査法の原理、試薬、検体の準備について示す。

### 1. 1 検査機器の準備 検体処理

#### 1.1.1 測定機器、器具・資材、試薬の準備

測定機器	Luminex システム, パーソナルコンピュータ
器具・資材	96 穴 V 底プレート (*Nunc), 96 穴 U 底プレート (*Corning), マイクロピペット (可変式: 1~20 $\mu$ L, 10~200 $\mu$ L, 100~1000 $\mu$ L), ボルテックスミキサー, プレートミキサー, マイクロ遠心機, マイクロプレート遠心分離機 (1,300 $\times$ g で使用可能なもの), 37°C 恒温水槽  *推奨メーカーを示す
試薬	ビーズミックス 10倍濃度溶血試薬 10倍濃度洗浄液 I 10倍濃度洗浄液 II 10倍濃度Lysis液 10倍濃度PBS 標識抗体 陰性コントロール血清

### 1. 2 検体の準備

#### 1.2.1 検体準備

- (1) 被検検体 (血清または血漿 (EDTA 採血)) を 10,000  $\times$  g で 10 分間遠心する。
- (2) 抗原として使用する検体は EDTA 加全血を用いる。

1. 3 検査法の原理

1.3.1 ICFA 法の概要および原理

immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA)法は,Luminex システムに antigen capture 法を応用した方法であり, ICFA 法の開発により交差適合試験に Luminex システムの応用が可能となった。ICFA 法による HLA 抗体検査 (交差適合試験) は蛍光ビーズに HLA クラス I 分子および HLA クラス II 分子に対するモノクローナル抗体を結合して, 可溶化した白血球から HLA クラス I 分子および HLA クラス II 分子をそれぞれ単離 (捕捉・精製) するものである。被検血清と反応させた白血球から HLA クラス I 分子および HLA クラス II 分子を単離すると, 血清中に HLA クラス I 抗体または HLA クラス II 抗体が存在している場合, 抗体が抗原と結合した状態 (抗原抗体複合物=免疫複合体) でビーズに捕捉されることから, R-phycoerythrin 標識抗ヒト IgG でそれぞれ HLA クラス I 抗原および HLA クラス II 抗原に特異的な抗体を検出することが可能である (図 1)。多種類の免疫複合体を特異的に同時に捕捉することによって抗体を検出する原理から, 1) 非特異的な反応が少ない, 2) HLA クラス I 抗体と HLA クラス II 抗体が同時に存在している場合でも容易に抗体の特異性解析が可能である, などの特徴がある。また, ICFA 法は全ての工程を 96 ウェルマイクロプレートによる処理が可能であることから多検体処理に適応し, 処理速度も約 2 時間でハイスループットな方法である。

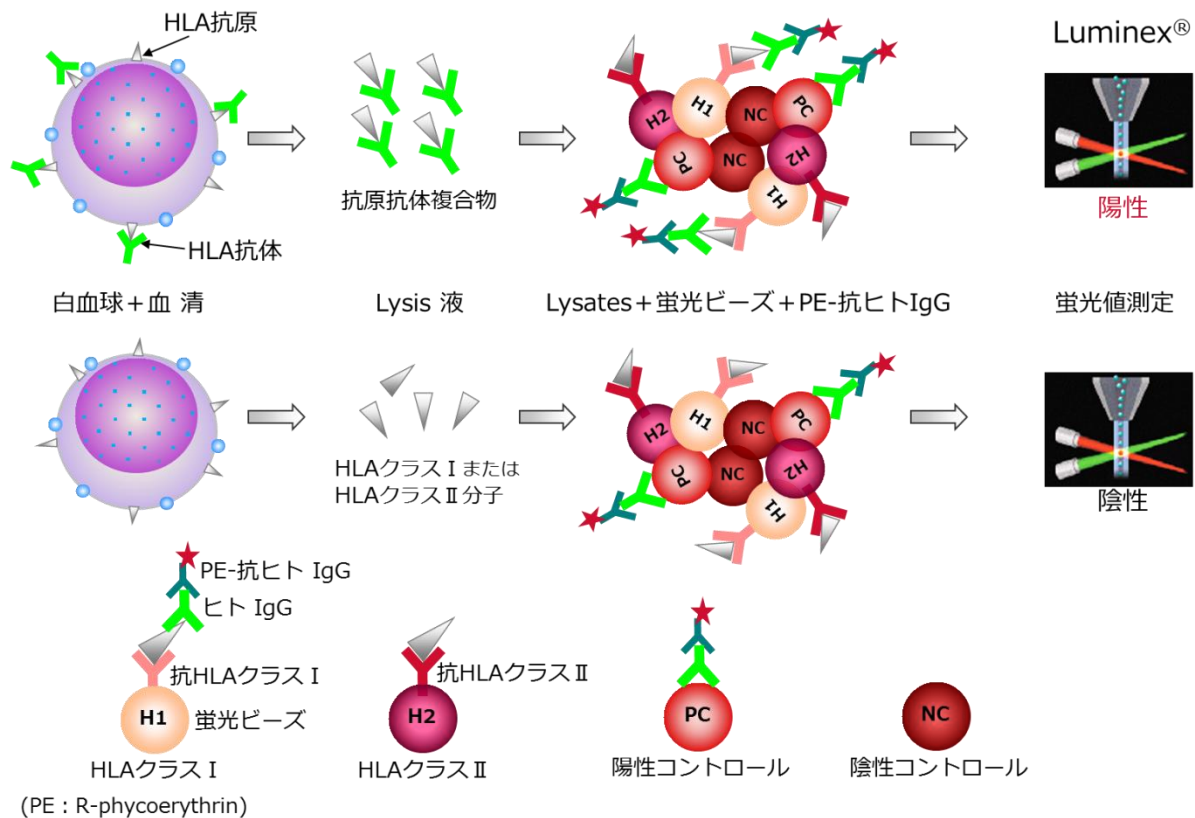


図1 ICFA法の原理

## 1. 4 検査手順

### 1. 4. 1 準備

#### (1) ビーズの処理

ビーズミックスをボルテックスにて 15 秒間攪拌する。

#### (2) 洗浄液の調製

- 1) 10 倍濃度試薬に析出物がある場合は 37°C 以下で加温して溶解し、析出物がなくなったことを確認する。
- 2) 10 倍濃度試薬は精製水で 10 倍に希釈する。希釈調製した各試薬は 2~8°C で保存し、1 週間以内に使用する。

### 1. 4. 2 操作手順

#### (1) 患者血清と白血球の 1 次反応および可溶化

- 1) 1.5mL サンプルチューブに溶血試薬を 1mL 分注し、37°C 恒温水槽で 5 分間加温した後、抗原として使用する EDTA 加全血を 100  $\mu$ L 添加する（陰性コントロール血清用と患者血清用として、1 検体あたり 2 チューブずつ用意する）。
- 2) ボルテックスにて攪拌した後、37°C 恒温水槽で 10 分間反応し、溶血させる。
- 3) 2,000  $\times$  g で 2 分間遠心後、上清を除去する。
- 4) 洗浄液 I を 500  $\mu$ L 添加し、ボルテックスにて白血球ペレットを再浮遊させる。
- 5) 2,000  $\times$  g で 2 分間遠心後、上清を除去する。
- 6) 洗浄液 I を 200  $\mu$ L 添加し、白血球ペレットを再浮遊させる。
- 7) 細胞浮遊液を 96 穴 U 底プレートの所定の位置に分注する。
- 8) 2,000  $\times$  g で 2 分間遠心後、上清を除去する。
- 9) ボルテックスにて白血球ペレットを再浮遊させた後、各ウエルに PBS を 60  $\mu$ L 分注する。
- 10) 該当する各ウエルに陰性コントロール血清 20  $\mu$ L, 患者血清 20  $\mu$ L をそれぞれ分注する。
- 11) シールをした後、プレートミキサーにて懸濁し、37°C 恒温水槽で 30 分間反応させる。
- 12) 反応液が隣のウエルに混入しないよう注意しながら、慎重にシールを剥がす。
- 13) 各ウエルに洗浄液 II を 200  $\mu$ L 添加し、2,000  $\times$  g で 2 分間遠心する。
- 14) スナッピングで上清を除去し、ペーパータオルで水分を良く吸い取る。
- 15) ボルテックスにて白血球ペレットを再浮遊させる。
- 16) 13) ~15) の操作を 3 回繰り返す。
- 17) 各ウエルに Lysis 液を 50  $\mu$ L 添加し、シールをした後、室温で 10 分間プレートミキサーにて攪拌し続ける。
- 18) 2,000  $\times$  g で 5 分間遠心する。

---

(2) 蛍光ビーズによる免疫複合体の捕捉および標識抗体との2次反応

- 1) 96 穴 V 底プレートのサンプル数に応じた各ウエルにビーズミックスを 5  $\mu$ L 分注する。
- 2) 対応するウエルに I で得られた可溶化白血球の上清を 25  $\mu$ L 添加する。
- 3) シールをした後、遮光しながら 25°C で 20 分間プレートミキサーを用いて攪拌して反応させる。
- 4) シールに反応液が付着している場合は、隣のウエルに混入しないよう注意しながら、慎重にシールを剥がす。
- 5) 各ウエルに洗浄液 II を 200  $\mu$ L 添加し、2,000  $\times$  g で 2 分間遠心する。
- 6) スナッピングで上清を除去し、ペーパータオルで水分を良く吸い取る。
- 7) ボルテックスにて蛍光ビーズを再浮遊する。
- 8) 5) ~6) の操作を再度行う。
- 9) 各ウエルに洗浄液 II で 100 倍に希釈した標識抗体を 50  $\mu$ L 添加する。
- 10) シールをした後、遮光しながら 25°C で 10 分間プレートミキサーを用いて攪拌して反応させる。
- 11) 反応液が隣のウエルに混入しないよう注意しながら、慎重にシールを剥がす。
- 12) 各ウエルに洗浄液 II を 200  $\mu$ L 添加し、2,000  $\times$  g で 2 分間遠心する。
- 13) スナッピングで上清を除去し、ペーパータオルで水分を良く吸い取る。
- 14) 各ウエルに洗浄液 II を 75  $\mu$ L 添加する (ビーズ塊が見える場合はシールをしてボルテックスにて分散させる)。

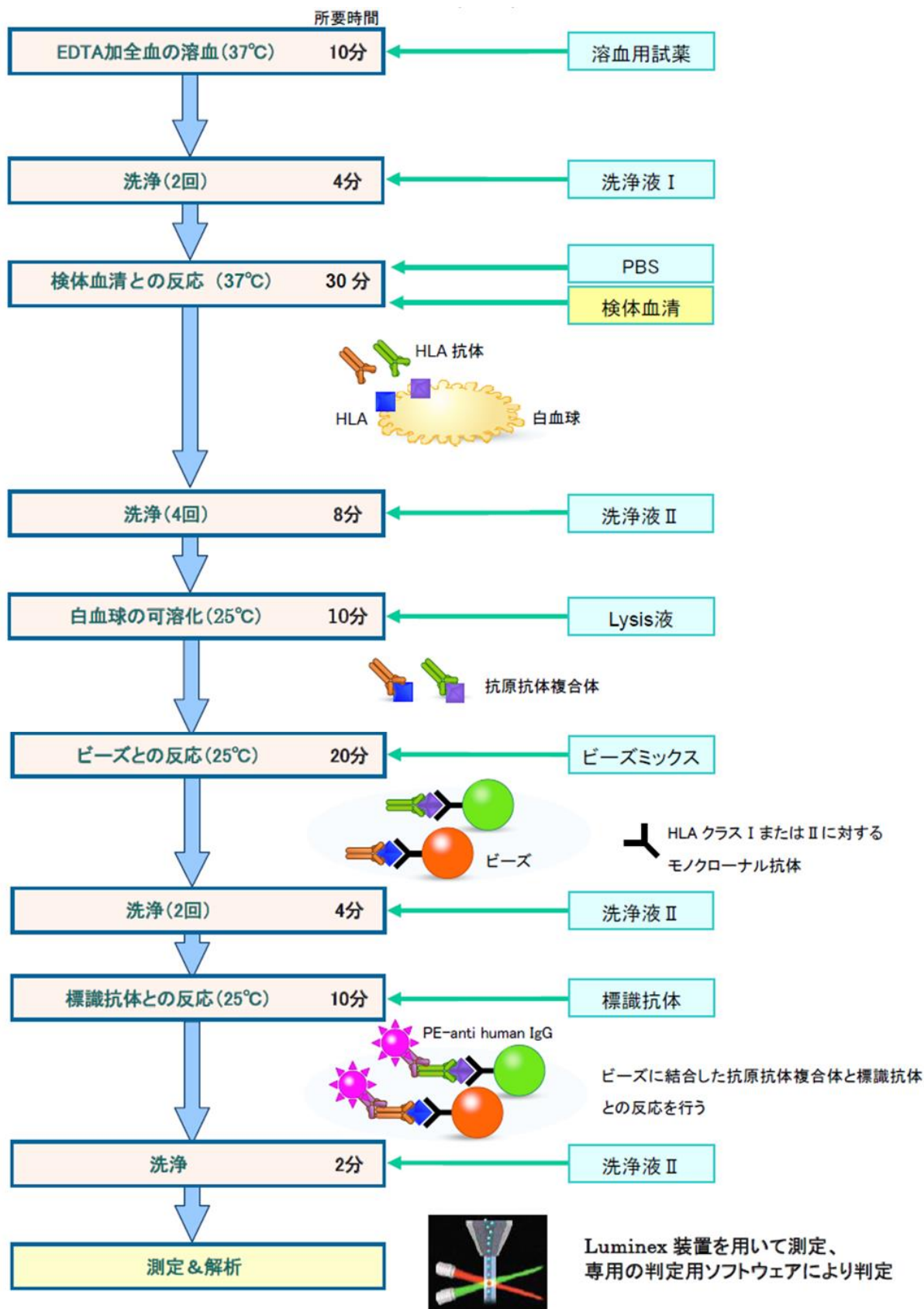
(3) Luminex システムによる蛍光値の測定

- 1) Luminex システムを用いて、ビーズミックスの Lot 番号に対応したテンプレートファイルを使用して測定する (LuminexXYP の温度設定が OFF になっていることを確認すること)。測定方法は Luminex IS 2.2/2.3 software User Manual に従う。

1.4.3 検査結果判定

測定結果の CSV ファイルを ICFA 解析ソフトウェアで判定する。ソフトウェアでは各ビーズの蛍光シグナルからインデックス値を算出し判定する。判定方法は、WAKFlow HLA 抗体 (ICFA) 判定ソフトウェア ver. 2.1 使用方法に従う。

1.4.4 操作概要 (ワークフロー)





2. 検査時の注意点

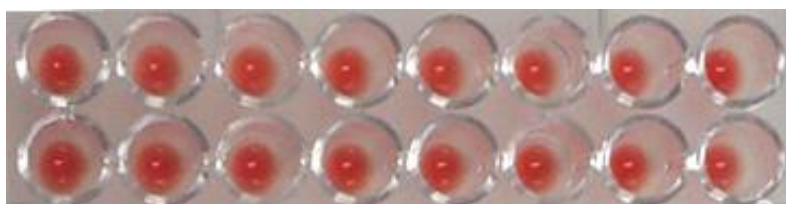
2. 1 検体の準備

溶血が不十分な場合、測定される蛍光値のバックグラウンドが高くなることがあるため、溶血させる時間や温度を厳守する。ACD またはヘパリン加血を用いた場合、1 回の溶血反応では十分溶血できないため、必ず 2 回溶血操作を行う。96 穴 U 底プレートを上から見て、赤血球で白血球ペレットが隠れてしまう場合、再度溶血操作を行う（写真 1、2）。

写真 1 十分な溶血



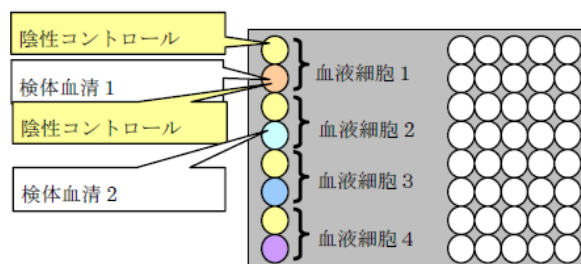
写真 2 不十分な溶血  
(再溶血が必要)



2. 2 検体レイアウト

ICFA 法は、血液細胞と検体血清中 HLA 抗体の反応強度を陰性コントロール血清と比較して判定するため、検体毎に陰性コントロール血清を使用する必要がある。図 2 の検体レイアウトに従い検査を行う。

<血液細胞に 1 種類の検体血清を反応させる場合>



<血液細胞に複数の検体血清を反応させる場合>

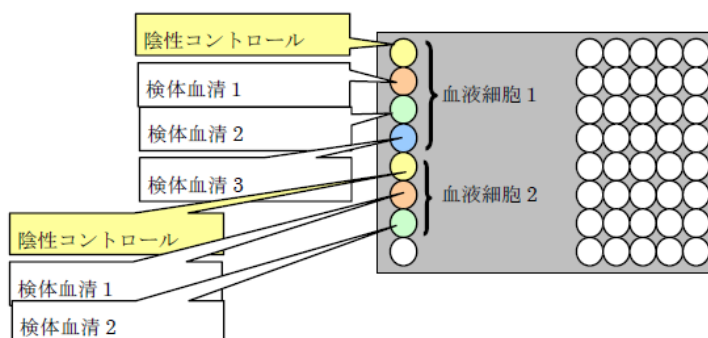


図 2 検体レイアウト

---

**2. 3 操作時の注意点**

## 2.3.1 使用する検体

抗原として使用する検体の白血球数が少ない場合 (1 反応あたり 20,000 個未満), 偽陰性を呈することがある。

## 2.3.2 可溶化上清採取

1 次反応後, 可溶化した上清を採取する場合, 沈殿を巻き込まないように注意する。(沈殿を一緒にとってしまうと Luminex 機器の流路が詰まる恐れがある)。

## 〔参考文献〕

Fujiwara K et al.: Application of bead array technology to simultaneous detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. *Vox Sang* 2009; 96: 244-251.