

QCWS 参考プロトコル

HLA 抗体検査 (MPHA 法)

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 検体の処理.....	1
1. 3 検査の手順.....	2
2. 判定.....	4
2. 1 判定方法.....	4
2. 2 判定基準.....	4
2. 3 HLA 抗体の鑑別.....	4
2. 4 判定時の注意点.....	4

1. 検査の準備

ここでは MPHA 法を原理とした市販キット（体外診断用医薬品 抗血小板抗体キット anti-PLT・MPHA・スクリーンおよび研究用試薬 anti-HPA・MPHA・パネル：ベックマン・コールター社）について示す。

1. 1 検査機器の準備と検体処理

1.1.1 検査器具・資材の準備

器具・資材	湿潤箱、洗浄用容器、マイクロピペット（10～100 μ L、100～1000 μ L）、メスシリンダー、チップ、ペーパータオル等
anti-PLT・MPHA・スクリーン (試薬)	抗原プレート 抗ヒト IgG 抗体（ウサギ由来）感作セル 感作セル復元液 未感作セル 陽性コントロール 陰性コントロール 検体希釈液 洗浄液（25 倍濃縮液）
anti-HPA・MPHA・パネル (試薬)	パネルプレート 抗ヒト IgG セル セル復元液 クロロキン溶液 検体希釈液 洗浄液（25 倍濃度液）

1. 2 検体の処理

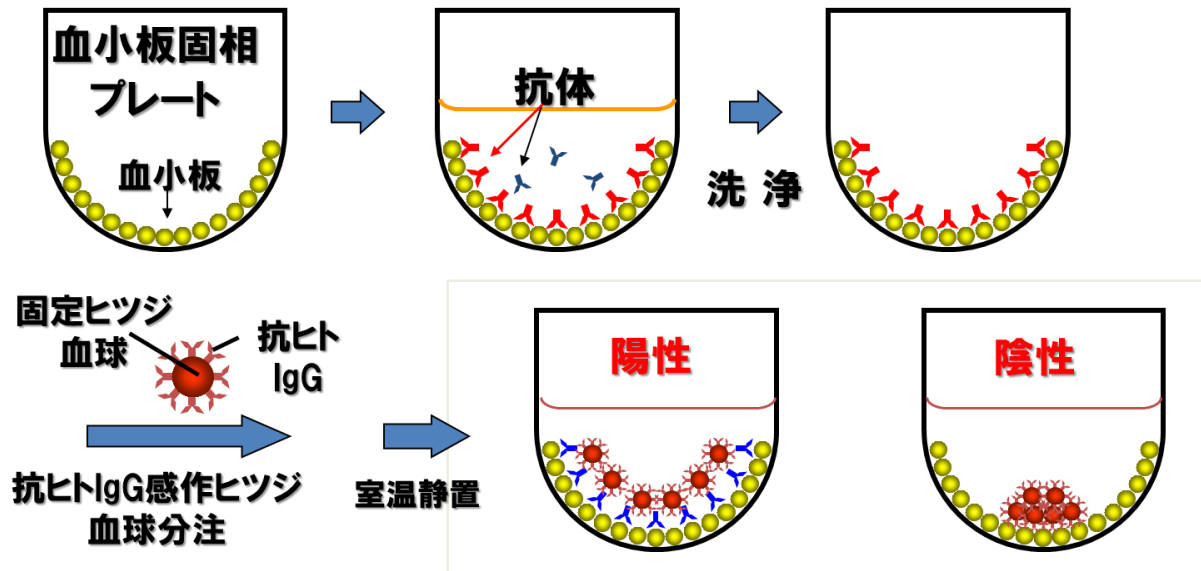
血清検体を準備し、遠心により沈査を十分取り除いてから使用する。検体が血漿の場合や、フィブリンの析出等が認められた場合は、適宜脱フィブリン処理を実施する。不活化した検体は用いないこと！

参考) 検体の脱フィブリン処理

- ① 検体を遠心（3,000rpm x 10 分）し上清を分離する。
- ② で得た上清のうち必要量をガラス製の試験管（またはマイクロチューブ）に分注する。
- ③ ②に 1M CaCl₂を 1/100 量加えてよく混和する。

- ④ ③にトロンピン（1000 単位）を③で加えた CaCl₂ の 1/2 量を加えてよく攪拌する。
- ⑤ 37℃ウォーターバスで 1~2 時間加温したのち 4℃で一晩静置する。
- ⑥ フィブリン塊を取り除いた後、上清を使用する。

1. 3 検査の手順



(1) 検査の原理（混合受身凝集法：Mixed Passive Hemagglutination：MPHA）

(2) 操作手順

【事前準備】

- ▶ アルミパックに入ったままの抗原プレートを箱から取出し室温に戻す。
- ▶ 抗原プレート（パネルプレート）は必要数取り出したら確実に封をして箱に戻し 2~10℃で保管する。
- ▶ 感作セルはセルの分注操作の 1 時間以上前には復元液を加えて静かに転倒混和しておく。復元後のセルは 1 ヶ月以内（1 ヶ月後が使用期限を超過する場合は使用期限内）に使用する。
- ▶ 洗浄液（25 倍濃縮液）を精製水で 25 倍に希釈する。
- ▶ 作業は静電気の影響を受けないように常温湿潤状態（写真 1）で実施すること。

【操作法】

図 1. MPHA 法の原理

- ① 検体および陽性コントロール、陰性コントロール（パネルの場合はコントロール不要）を検体希釈液で 4 倍に希釈する。
- ② クロロキン処理を行う場合は、洗浄する前に 50 μL のクロロキン溶液を直接ウェルに分注し、2 時間反応させる。反応後③を省略して④に進む。
- ③ 調整済みの洗浄液を入れた容器に完全に抗原プレート（パネルプレート）を浸して 5 分間おく（写真 2）。

- ④ 新しい洗浄液に置換してさらに5回洗浄操作を繰り返す（写真3）。
- ⑤ 抗原プレート（パネルプレート）を逆さまにしてペーパータオル等の上で軽くたたき水分を除去する。
- ⑥ ①で希釈したコントロールおよび検体を各ウェルに25 μ Lずつ分注する。
- ⑦ 湿潤箱に静置して **2時間反応**する（卓上遠心機など周りに振動するものがない環境に設置する）（写真4）。
- ⑧ 2時間後、**ウェルの反応液を捨てる**。その後洗浄液で4回洗浄する。
- ⑨ **新しい洗浄液に置換して**さらに1回洗浄する。抗原プレート（パネルプレート）を逆さまにしてペーパータオル等の上で軽くたたき水分を除去する。
- ⑩ 感作セルおよび未感作セルを25 μ Lずつ分注する（パネルプレートの場合は未感作セル不要）。
- ⑪ セルを分注後、プレートの端を軽くたたいて混和する。**この際ウェルに気泡が混入していないことを確認する*注1）。**

注1) 気泡があればティスポのスポイド等でウェルに風を吹きかけ泡をつぶすようにする。抗原固相表面は傷つきやすいためピペットの先端を接触させ内容に注意する事。

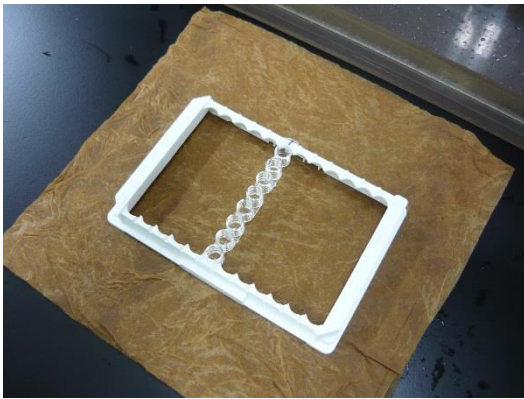


写真1. 静電気による影響を避けるため常に濡れたペーパータオル等の上で作業をする！

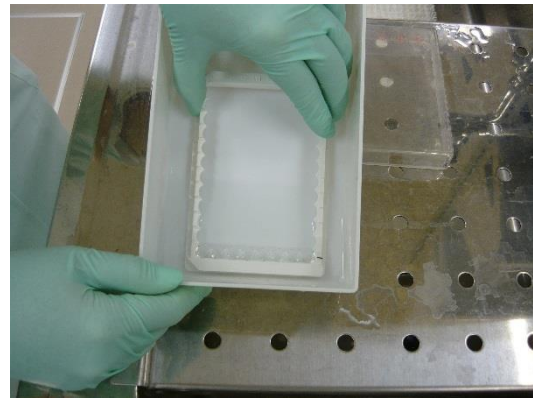


写真2. ウェルに気泡が入らないように気を付けて！



写真3. 全てのウェルを均一に洗浄するため洗浄液を除去する際は十分なブリックで水分を振り落とす！

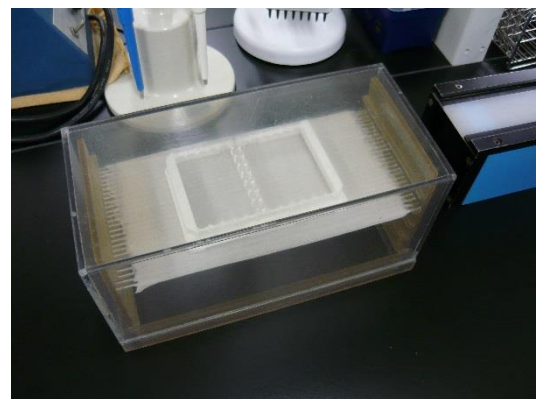
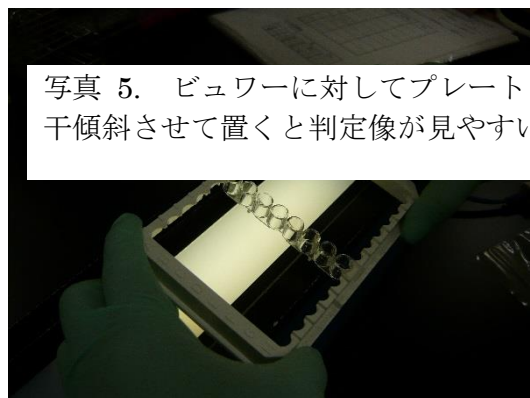


写真4. 判定像がゆがまないように水平な場所に湿潤箱を設置する。プレートの下に敷いた濡れガーゼ等もシワなどのデコボコが無いように注意！

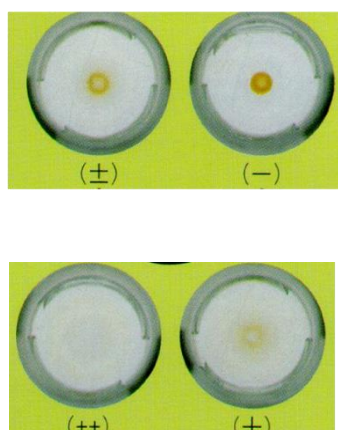
2. 判定

2. 1 判定方法

- (1) 抗原プレート（パネルプレート）をビューワー等の上に静かに載せる（写真 5）。
- (2) 陰性コントロール、陽性コントロールの未感作セルが陰性であること、感作セルではそれぞれ陰性、陽性であることを確認する（パネルプレートの判定の場合は不要）。
- (3) 検体の未感作セルの結果が陰性であることを確認したのち下表（図 2、表 1）に従って判定する。



2. 2 判定基準



陰性

陽性

判定		判定基準
陽性	++	粒子がウェルの底面全体に凝集して、一様な粒子の広がりが見られます。
	+	ウェルの底面中心部に大きく薄く、わずかに粒子の集合がみられます。
陰性	±	粒子がリング状に見られますが、その周辺に血球の分散が見られます。
	-	ウェルの底面中心部に全粒子が集まり、きれいなリングを形成します。

表 1.判定スコアおよび判定基準

2. 3 HLA 抗体との鑑別

クロロキン処理により 多くの抗 HLA 抗体の反応性を減弱することができるが反応を完全に消失させることはできない。そのため、クロロキン処理と未処理の反応性の差から抗 HPA 抗体と抗 HLA 抗体の鑑別をする場合は注意を要する。

2. 4 判定時の注意点

anti-PLT・MPHA・スクリーンおよび anti-HPA・MPHA・パネルは、抗血小板抗体検出用キットであることから HLA 抗体の検出については偽陰性の可能性もあり十分な注意が必要である。また含まれる HLA 抗原の数が少ないため検体の HLA 抗体特異性解析には適していない。