

QCWS 参考プロトコル

WAKFlow_MR 抗体検査

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. 検体の処理.....	1
1. 1 操作上の注意事項.....	1
1. 2 準備.....	1
2. 検査の手順.....	2
3. 検査結果判定.....	6
4. 血清処理試薬を用いた再検査.....	11

1. 検体の処理

1.1 操作上の注意事項

- (1) すべての操作は、できるだけ光が当たらないように注意して行ってください。
- (2) 検体血清中にはウイルス、細菌等の感染性のものが含まれている恐れがありますので、感染防止のため、操作の際はご注意ください。

1.2 準備

(1) 検体血清の前処理

検体血清は、アッセイの前に必ず $10,000\times g$ で 2 分間遠心分離し、不溶物を沈降させる。

■アッセイの際に不溶物の混入があると、抗原抗体反応を阻害して正しい結果が得られなくなる恐れがあります。

(2) ビーズの処理

①ビーズミックスをボルテックスミキサーにより、しっかりと攪拌しておきます。

■ビーズミックスの攪拌操作※は、ビーズミックスチューブの上部を指で押さえ、回転数の目盛を最大にしたボルテックスミキサーで 5 秒以上攪拌します。

※ビーズミックスの攪拌操作図



(3) 洗浄液の調製

②10 倍濃度洗浄液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します。

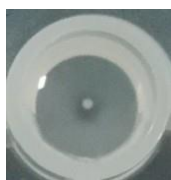
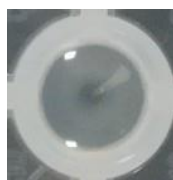
②10 倍濃度洗浄液を精製水で 10 倍に希釈し、洗浄液を調製します。なお、操作後の残った洗浄液は、2~8°Cで保存し、1 週間以内に使用してください。

(4) Luminex 装置：セットアップを行います。

2. 検査の手順

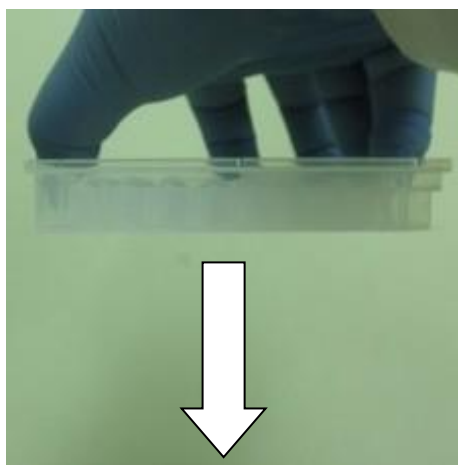
- (1) ①ビーズミックス 25uL を 96 穴 V 底プレートの各ウェルに分注します。
- (2) これに検体血清 5uL を添加します。
 - 検体血清採取時は、チューブの壁や底に固着した沈殿物を持ち込まないように注意して上清を取り、ウェルに入れてください。
 - 検体ごとにチップを交換してください
- (3) 反応ウェルに隣のウェルの検体が混入しないように隙間無くプレートシールを貼付した後、遮光(遮光可能なインキュベーター内、あるいはアルミホイル等で覆う)して 25℃、30 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。
 - 反応を行っている間に、Luminex システムの測定準備をしておきます。
 - プレートシール貼付時、隙間無く貼付するため、シール接着面の水分をペーパータオル等で十分に拭き取ってください。以後、プレートシール貼付時に毎回実施します。
- (4) 反応後、反応液が隣のウェルに混入しないよう注意しながら、慎重にシールをはがします。
 - シールに反応液が付着している場合、500×g、2 秒間プレート遠心分離機にかけることでシールに付着した反応液を振り落としてください。以後、シールに反応液が付着している場合は毎回実施します。
- (5) 洗浄液 150uL を各ウェルに加え、プレート遠心分離機で 1,300×g、2 分間遠心分離を行います。遠心分離の後、上清をスナッピングにより除きます。
 - 遠心分離の後、ビーズがウェルの中央部で沈降していることを確認してください。きれいに沈降していない場合、プレートを 180 度回転させてプレート遠心分離機にセットし、10 秒程度遠心分離を行うと改善する場合があります。以後、遠心分離時に毎回実施します。

×ビーズ沈降不良 ○ビーズ沈降良好



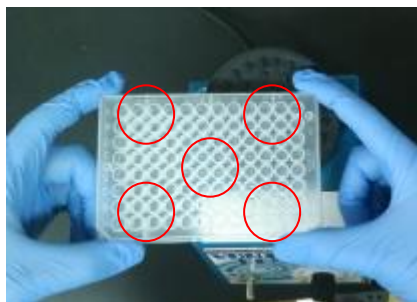
スナッピング※は逆さまにしたプレートを鉛直方向に振り下ろすことでウェル内の洗浄液を排出してください。プレートは逆さまのままペーパータオルに押し付けてウェルの淵に残った水分を取り除いてください。ウェル毎の反応液の残量に極端な偏りが出ないように注意してください。ウェル内の残液量は、通常はビーズを含めて 5uL 以下です。スナッピングが弱すぎる場合、反応液の残量に偏りが生じやすくなります。スナッピングが強すぎる場合、ウェル内のビーズが脱落することがあります。以後、上清除去時に毎回実施します。

※スナッピング操作説明



①プレート表面を上にして保持する。
 ②プレートをウェル内の液が漏れないよう、素早く回転させて逆さまにし、そのまま鉛直方向に振り下ろして止め、慣性を利用してウェル内の洗浄液を排出する。(ビーズがウェル底からずれ、洗浄液と共に排出されることを防ぐため、プレートの回転時はプレート表面に対して鉛直方向に負荷をかけるよう、注意する。)

- (6) 洗浄液 150 μ L を各ウェルに添加し、しっかりとプレートシールを貼付し、ボルテックスミキサーにて攪拌した後、1,300 \times g、2分間遠心分離を行います。遠心分離の後、上清をスナッピングにより除きます。



プレートの攪拌操作について、赤枠で 5 箇所 の 支 点 例 を 示 した。ウエルの位置によって攪拌にムラができないよう、注意する。

■※ボルテックスミキサーによる攪拌は、5秒以上支点を変えながら実施し、ウエル内で渦を巻いていることを確認してください。洗浄液添加後のボルテックス攪拌時は毎回実施します。

※ボルテックスミキサーによるプレートの攪拌操作図

(7) (6)の操作を更に2度繰り返します。

■2分間の遠心分離を行っている間に、③標識抗体を洗浄液で100倍に希釈しておきます。

(8) 希釈した標識抗体 50uL を各ウエルに添加します。

(9) しっかりとプレートシールを貼付した後、遮光(遮光可能なインキュベーター内、あるいはアルミホイル等で覆う)して25℃、30分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。

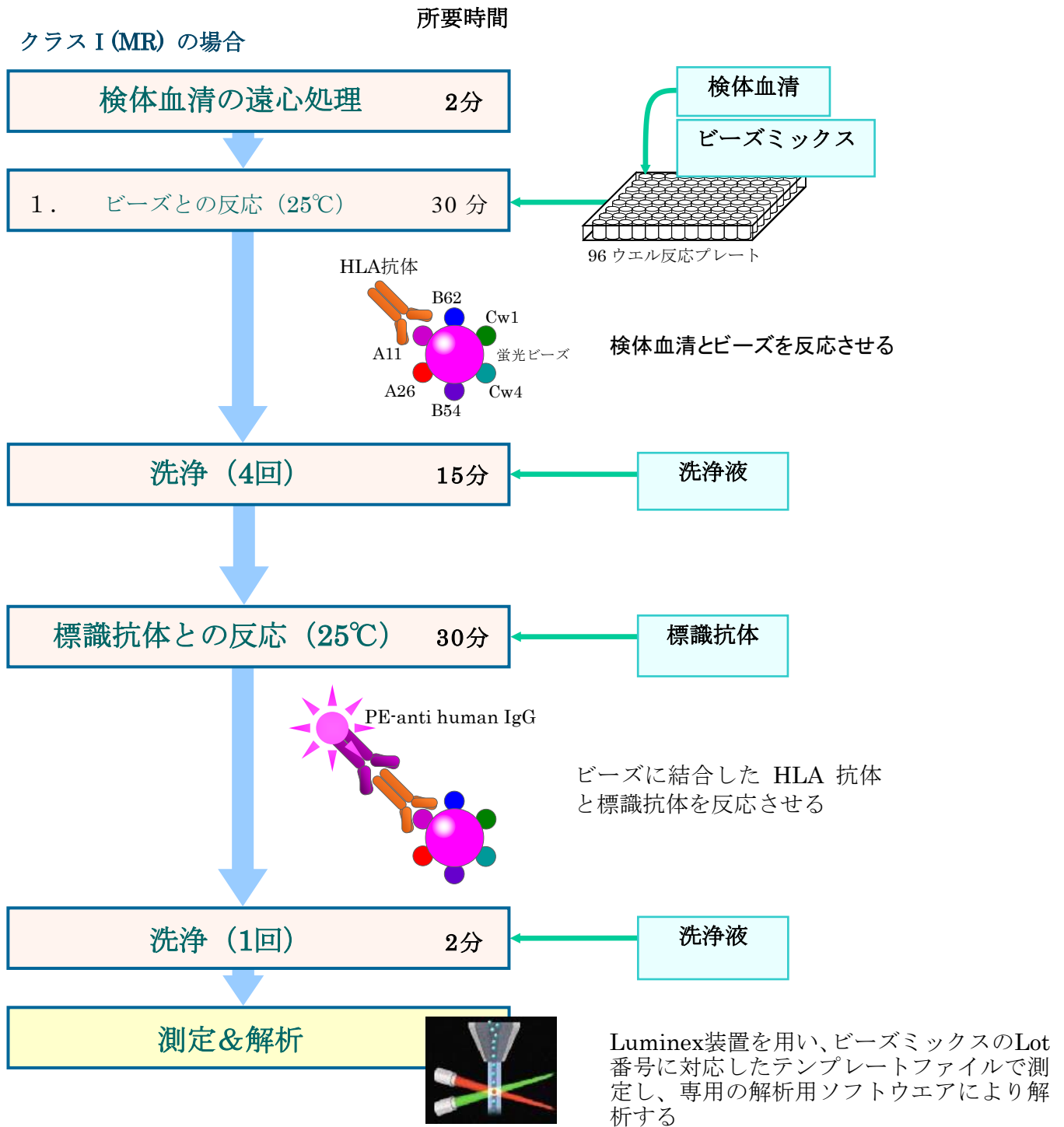
(10) 反応後、慎重にシールをはがし、各ウエルに洗浄液 150uL を加え、1,300×g、2分間遠心分離を行います。遠心分離の後、上清をスナッピングにより除きます。

(11) 各ウエルに洗浄液 75uL を添加します。ビーズの塊が見える場合は、プレートシールを貼付してボルテックスにより分散させてください。プレートシールに付着した反応液は500×g、2秒間プレート遠心分離機にかけることで振り落としてください。プレートシールをはがしてください。

(12) 測定

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 (IS の場合) 或いはプロトコルファイル (xPONENT 或いは BioPlex の場合) を使用して測定を行います。

【原理と操作概要】



3.検査結果判定

(1) 解析方法概要

解析用ソフトウェアでは、Luminex システムの測定データを取り込み、各検体についてそれぞれカットオフ値を設定します。

カットオフ値よりも大きい Index 値 (Luminex 装置の測定結果から得られた蛍光値 (Median) を補正した値) を示したビーズを陽性ビーズ、小さい場合を陰性ビーズとします。

ある抗原について、この抗原を有する全てのビーズが陽性反応を示した場合、この抗原は陽性であると判断します。

一方、ある抗原について、この抗原を有するビーズのうち一つでも陰性反応を示した場合は、この抗原は陰性であると判断します。

ただし、あるビーズ上のある抗原について、予め弱反応指定している場合は、このビーズのその抗原は判断から除外されます。

(2) Index 値計算方法

Index 値の計算は、検体 (X) に対して HLA 分子を固定した任意のビーズの Median 値 (XPc) と検体 (X) に対する陰性コントロールビーズの Median 値 (XBB)、そして標準陰性コントロール血清 (N) に対する任意のビーズ (NPc) と陰性コントロールビーズ (NBB) の Median 値を用いて以下の計算式で求めています。

$$\text{Index 値} = (\text{XPc} - (\text{NPc} - \text{NBB}) \times (\text{XBB} / \text{NBB})) / \text{XBB}$$

例えば以下のような蛍光値 (Median) を示した例では、検体 (x) に対する Pc○○ の Index 値は次のように計算されます。

	BB	Pc○○
検体 (X)	300	3000
標準血清 (N)	1000	2000

$$\text{Index}(X_{\text{Pc}\text{○○}}) = \frac{3000 - (2000 - 1000) \times \frac{300}{1000}}{300} = 9$$

(3) カットオフ設定基準

検体ごとにバックグラウンド値の幅があるため、カットオフ値は検体ごとに自動的に算出します。

ただし真のカットオフ値については、自動判定では判断できないため、実際の測定者が確認したうえで、確定するものとします。

(4) 解析方法紹介

解析を進める上で最も迷う点としてカットオフ値の設定が挙げられます。解析用ソフトウェアでは Index 制を採用することで、検体の個体差による反応ベースラインのバラツキを補正することが可能となりますが、全検体において共通のカットオフ値を用いることは出来ません。

また、反応性が明確でない検体などは、ソフトウェアの解析プログラムでカットオフ値を決定することができず、暫定的にカットオフ値が「2」に設定され、「Notice」欄に反応性が矛盾するビーズ名が表示されると共に、マップ上の矛盾ビーズが黄色で表示されます。

(反応性が矛盾するビーズとは、そのビーズ自体は陽性として判定されているものの、そのビーズ上の全ての抗原が、判定ロジック上陰性と判定されているビーズです。)

このような検体については、手動でカットオフ値を設定する必要があります。

手動でのカットオフ値変更手順は、

①カットオフ値を任意に設定し、矛盾が解消されるか確認します※。

※矛盾ビーズが有するある抗原についてカットオフ値を変更することでその抗原を陰性（あるいは陽性）にして、さらにその抗原を持つ別のビーズに新たな矛盾が生じない事を確認した上で矛盾を解消します。ただし、過度にカットオフ値を下げることは適切ではありません。カットオフ値の下限は 1.5 程度です。

②①で実施したカットオフの変更を実施しても矛盾が解消出来ない場合があります。その場合は以下の要因を考慮して解析をします。(5) 解析例を参照)

(ア) Cw 抗原因由来

矛盾ビーズが Cw 抗原を由来として陽性反応を示している。

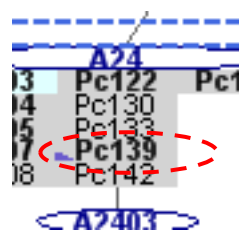
(イ) 非特異反応と弱反応

判定ソフトの抗原マップ画面のビーズ名にビーズ特性をコメントしています。

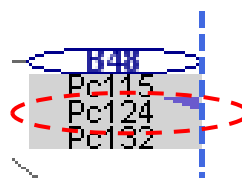
左下三角はバックグラウンドが高めになりやすいビーズ特性を示しています。

右上三角はそのビーズはその抗原の反応性が弱めになる場合があることを示しています。

バックグラウンドビーズ



弱反応ビーズ



(ウ) IgM 抗体

MR 試薬では 2 次抗体として抗ヒト IgG (H+L) を用いるため、IgM 抗体が原因となる非特異様反応を示す場合もあります。

(5) 解析例

①非特異反応

ここに示す検体「WMR05」は、Result Info 画面の Notice 欄に、矛盾ビーズとして「Pc139」が表示されており、同時にグラフ、及びマップ上のこれらビーズ名が黄色でアピールされています。マップを確認すると、ビーズ名「Pc139」の左下に三角形が表示されています。この左下の三角形は非特異反応を示しやすいビーズ特性を持つことから、検体「WMR05」における「Pc139」の陽性シグナルは偽陽性反応と判断します。

	BB	PB	Pc121	Pc120	Pc129	Pc109	Pc123	Pc145	Pc101	Pc118	Pc132	Pc130	Pc138	Pc124	Pc127	Pc143	Pc106	Pc139	Pc131	Pc103	Pc1
Median	306	20860	14667	12515	7819	6528	5503	3938	3707	2952	2988	1897	1353	1122	1088	1155	975	789	827	731	56
Index	1.0		48.2	41.5	26.0	21.9	18.3	13.1	12.7	10.3	10.1	6.7	4.5	4.2	4.0	4.0	3.6	3.1	3.1	2.8	2.7

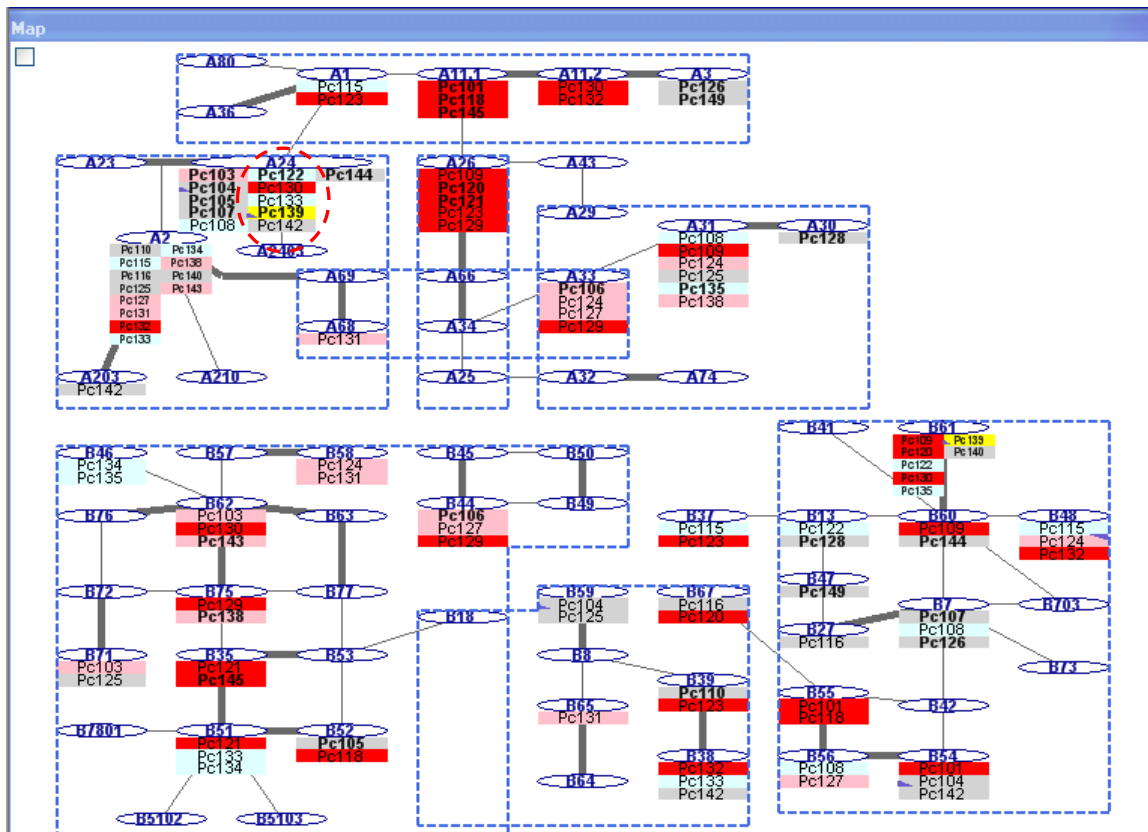
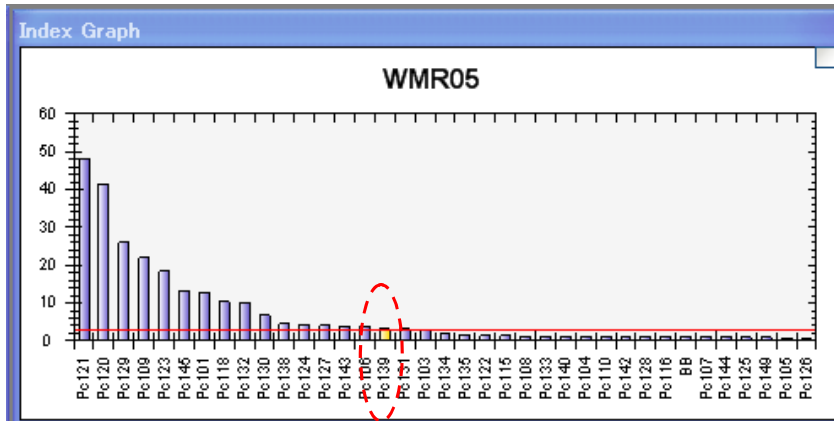
result

Lot: ROB Current Cutoff: 2.46 Notice: Pc139

Acceptable 1: A3, B47, B7, B59, B27, A30, A203, B13, B46

Acceptable 2: B71, A24, B52, A2, B38, B54, B60, B56, A31, B39, B67, B51, B48, B61, B37, A1

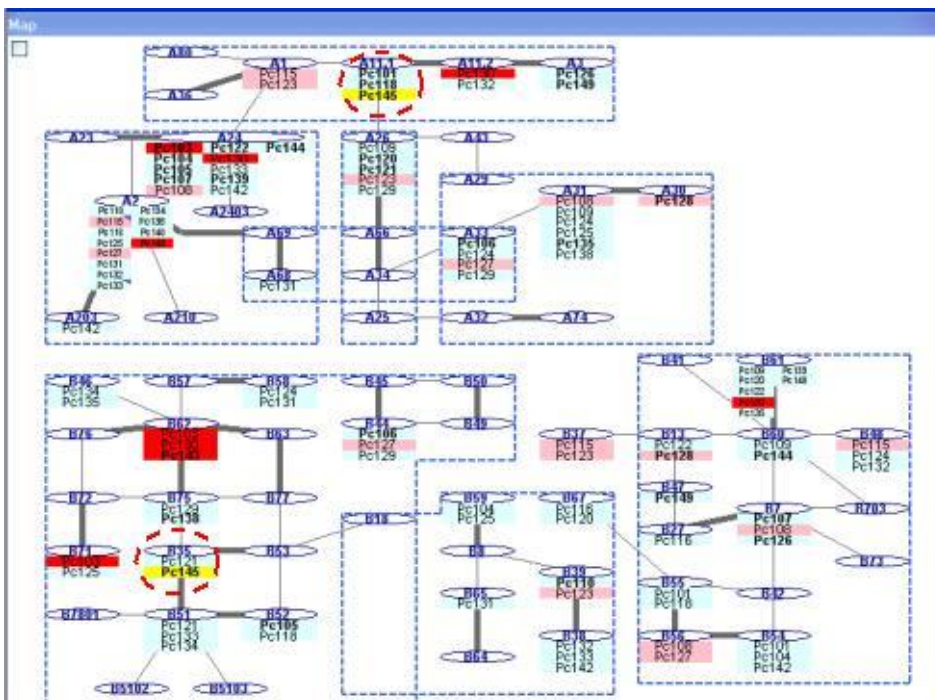
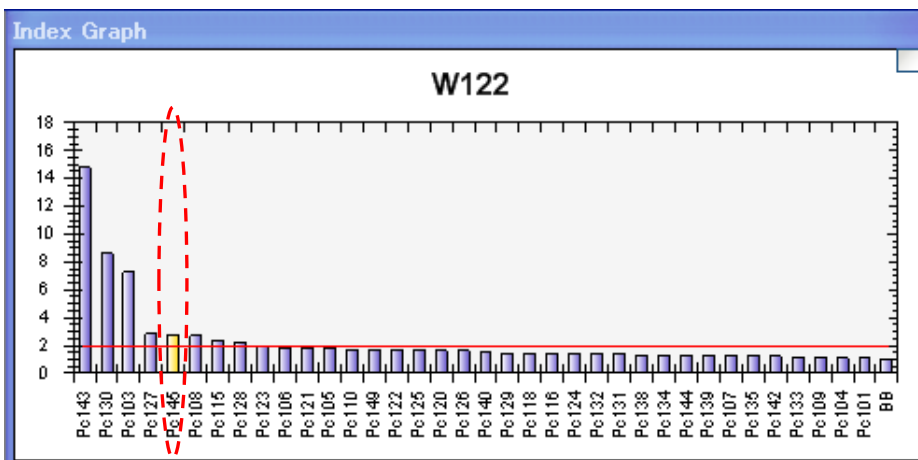
Specificity: A26, B35, A11.1, B75, B55, A11.2, B44, A33, B62, B58, A68, B65

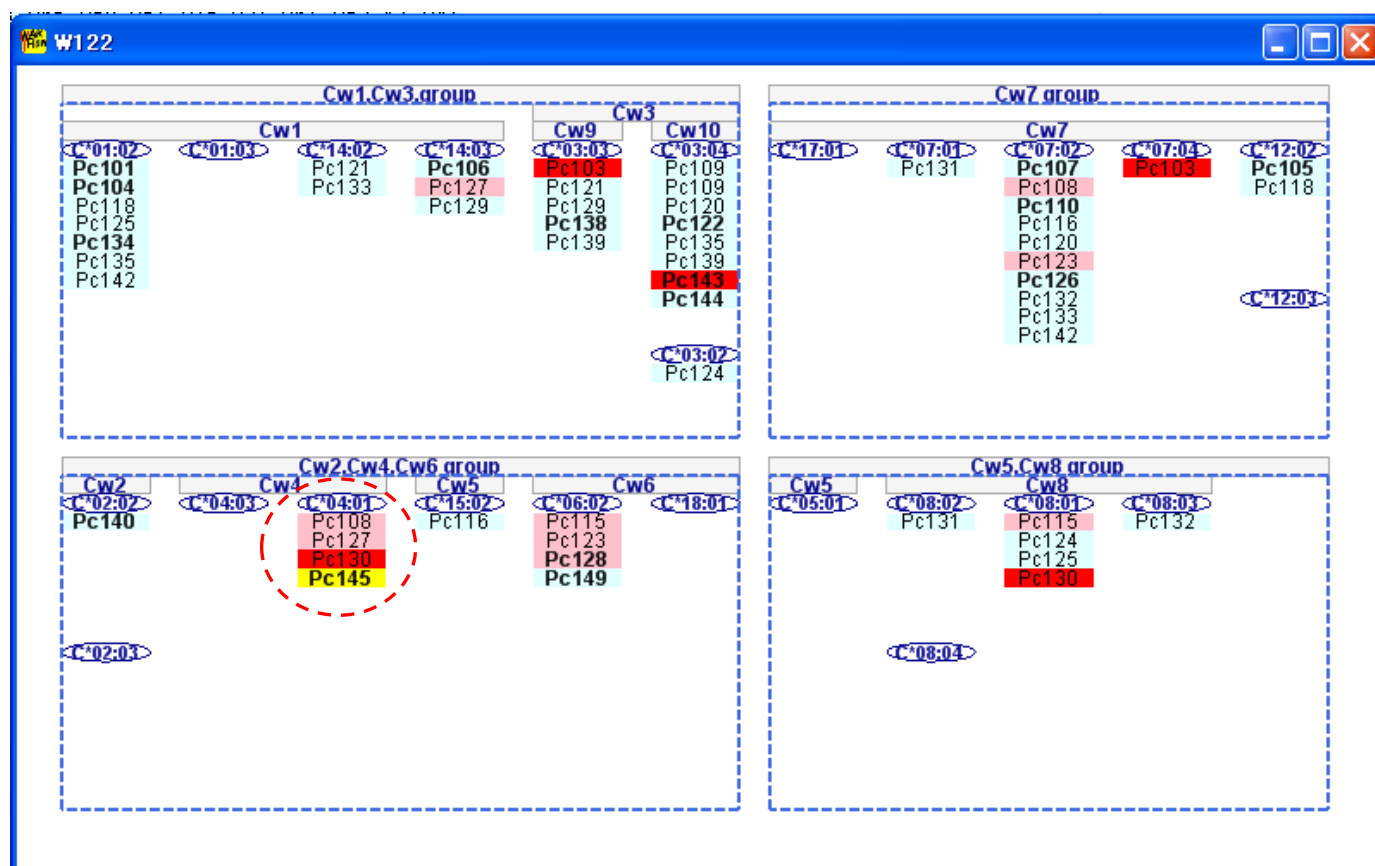
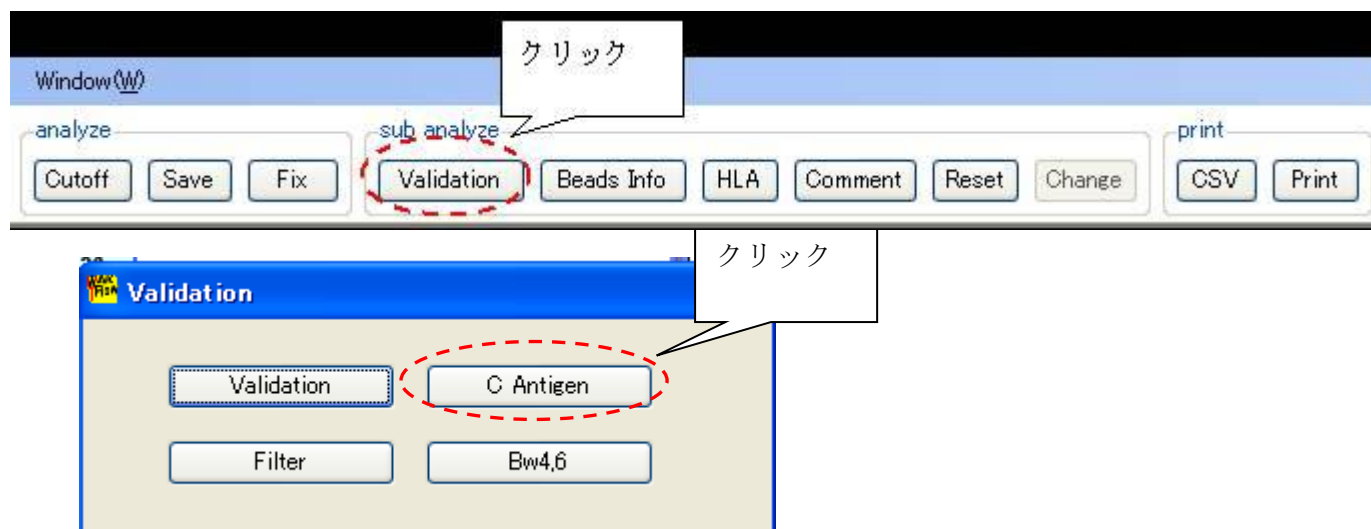


②Cw 抗原

ここに示す検体「W122」は、Result Info 画面の Notice 欄に矛盾ビーズとして「Pc145」が表示されており、同時にグラフ、及びマップ上のこれらビーズ名が黄色でアピールされています。解析ソフトウェアにおける判定では Cw 抗原が考慮されていないため、この矛盾ビーズの反応が Cw 抗原由来である可能性が考えられます。「Validation」を開き、「C Antigen」をクリックすると、ビーズの Cw 抗原の反応グループを確認することができます。Cw 抗原の反応グループより、「Pc145」の反応は C*04:01 の特異性を示していると推測されることから、この陽性反応は妥当であると判断します。

	BB	PB	Pc143	Pc130	Pc103	Pc127	Pc145	Pc108	Pc115	Pc128	Pc123	Pc106	Pc121	Pc105	Pc110	Pc149	P
Median	684	8296	9591	5368	4480	1517	1363	1331	1068	1194	1155	836	789	1028	667	777	
Index	1.0		14.8	8.6	7.3	2.9	2.8	2.7	2.3	2.2	1.9	1.9	1.8	1.8	1.7	1.7	





(6) 再検査の目安

① BB 値

MR の測定結果が MFI 値 500 以上を示した場合、血清処理試薬を使用して再試験を実施して下さい (4. 血清処理試薬を用いた再検査参照)

② PB 値

MR の測定結果が MFI 値 8,000 未満を示した場合、再試験を実施して下さい。PB 値の低下は、洗浄不足が原因と考えられます。

4. 血清処理試薬を用いた再検査

血清処理試薬による前処理方法

- (1) 血清処理試薬を十分にボルテックスして、攪拌します。
- (2) 血清処理試薬 2uL と検体血清 8uL を混和します。(クラス I、II 同時アッセイの場合は血清処理試薬 3uL と検体血清 12uL を混和します。)この際、試薬に添付してある陰性血清も同様に処理することが必要です。(解析の際に、処理した陰性血清の値を、処理血清の陰性コントロールとして使用します。)
- (3) 25℃、30 分間攪拌し続けます。あるいは、混和後、4℃で一晩静置させます。
- (4) 反応後の検体血清を 10,000×g で 2 分間遠心します。
- (5) 沈殿のビーズが混入しないように上清 5uL を測定に使用します。