

全血クロスマッチ プロトコル (案)

日本移植学会 移植関連検査委員会
日本組織適合性学会 認定制度委員会
クロスマッチ WG

I. 細胞分離 (T リンパ球, B リンパ球分離)

- 1) ドナー血液は ACD 液加末梢血液を推奨する.
- 2) リンパ球分離は以下の方法等を用いる.
 - 2)-1 免疫磁気ビーズ法
 - 2)-2 比重遠心法
- 3) 目的細胞を純度良く分離し, 80%以上の生存率 (Viability) を確認する.

II. クロスマッチ試験 (リンパ球交差適合試験)

- 1) Complement dependent cytotoxicity (CDC) 補体依存性細胞傷害
= Lymphocyte cytotoxicity test (LCT) リンパ球細胞障害試験
1. リンパ球は $2 \times 10^3/\mu\text{l}$ 程度に調整する.
2. T, B リンパ球用のトレイを用意し, ミネラルオイルを $5\mu\text{l}$ ずつ分注する.
3. コントロール血清 (陰性, 陽性) と患者血清を, それぞれ $1\mu\text{l}$ ずつ分注する.
4. T リンパ球用トレイに, ドナーT リンパ球を $1\mu\text{l}$ ずつ分注する.
5. B リンパ球用トレイに, ドナーB リンパ球を $1\mu\text{l}$ ずつ分注する.
6. 37°C で 60 分間反応させる.
7. 補体 (ウサギ血清) を $5\mu\text{l}$ ずつ分注する.
8. 室温で 120 分間反応させる.
9. Acridine Orange/ Ethidium bromide 等の蛍光染色液を $5\mu\text{l}$ ずつ分注する.
(エオジン染色も可)
10. 倒立位相差蛍光顕微鏡にて, 全細胞に占める死細胞の%をカウントする.
11. 陰性コントロールと比較した死細胞の%を表記し, 判定する.

2) Flow Cytometry Crossmatch (FCXM) (フローサイトクロスマッチ)

1. ドナーリンパ球を $1.0 (0.5\sim 1.5) \times 10^4/\mu\text{l}$ 程度に調整する.
2. 試験管に陰性コントロール血清と患者血清をそれぞれ $30\mu\text{l}$ ずつ分注する.
3. 調整したドナーリンパ球を $30\mu\text{l}$ ずつ分注する.
4. 室温で 30 分間反応させる.
5. 冷生理食塩水を分注し, 遠心して洗浄する. (合計 3 回洗浄)
6. T リンパ球 (CD3), B リンパ球 (CD19) を標識する抗体を分注する.
7. 2 次標識抗体として Anti Human IgG-FITC 等を分注する.
8. 4°C 遮光で 30 分間反応させる.
9. 冷生理食塩水を分注し, 遠心して洗浄する. (合計 2 回洗浄)
10. フローサイトメーターにて測定解析.
各リンパ球の取り込みは, 10,000 個以上が望ましい.
11. 患者血清と陰性コントロールの中央チャンネル蛍光強度 (Median Channel Fluorescence Intensity) の比 (Ratio) を算出し, 判定する.