
QCWS 参考プロトコル
抗HLA 抗体検査 (LIFECODES C3d Detection)

2019 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

制定・改訂履歴

版数	制定日	制定理由	作成責任者
	施行日		
初版	2019年9月1日	日本組織適合性学会が開催するQCWSでのHLA検査を実施する際に用いる参考プロトコルとして制定した。	WG

目次

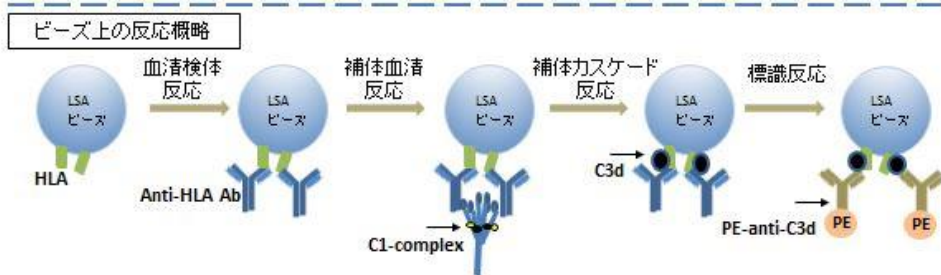
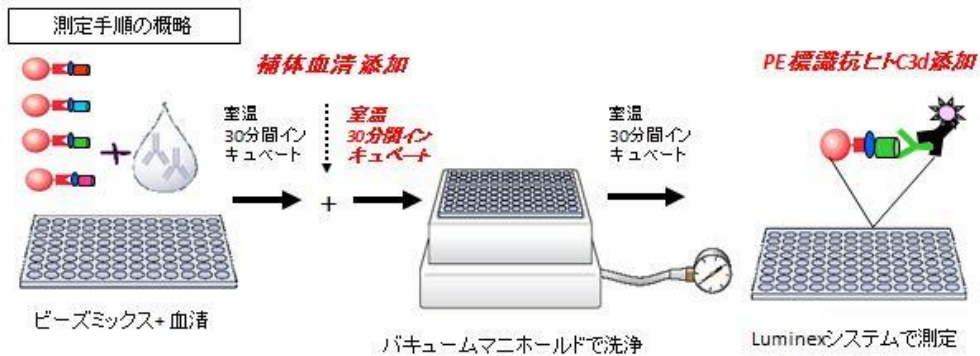
1. 概要と説明	1
2. 測定原理	1
3. キット内容および必要機器.....	2
4. 検体の調製	3
5. 検査手順	3
6. 結果判定	6
7. 結果判定の注意点.....	7

1. 概要と説明

LIFECODES C3d Detection は、抗原抗体複合体に結合する補体 C3d を検出するための研究用試薬である。

2. 測定原理

HLA 抗原が結合したビーズを血清検体と一緒に室温でインキュベートする。最初のインキュベーション後、補体血清（補体成分を含む 抗 HLA 抗体陰性血清試薬）を加えてさらに室温でインキュベートする。次にビーズを洗浄して未結合抗体を除去させる。その後フィコエリスリン (PE) 標識抗ヒト C3d 抗体を加える。もう一度室温でインキュベーション後、ビーズを洗浄する。最後に洗浄液を加えて Luminex 装置で分析する。検体に対する各ビーズのシグナル強度を使用して、抗原抗体複合体に結合した C3d が陽性か陰性かを判定する。



3. キット内容および必要機器

キット内容

製品名	容量	保存温度
C3d Conjugate (標識 C3d 抗体)	1,200 μ L	2~8°Cで暗所保管
Wash Buffer (洗浄液)	25 mL	2~8°Cで保管
Complement Serum (補体含有ヒト血清)	360 μ L ×2 バイアル	-65°C以下で保存
C3d Positive Control Bead (C3d 陽性コントロールビーズ)	24 μ L	-65°C以下で保存

※C3d アッセイには、LSA キットに含まれる以下の構成品を使用する。

LSA キット中で使用する構成品

製品名	容量	保存温度
LSA Beads (LSA ビーズ)	960 μ L	-65°C以下で暗所保管
Positive Control Serum (陽性コントロール血清)	100 μ L	2~8°Cで保管
Negative Control Serum (陰性コントロール血清)	100 μ L	2~8°Cで保管

必要機器および資材

測定機器	Luminex システム
測定プレート	ミリポアマルチスクリーンフィルタープレート※ (イムコアカタログ番号: TP-5002) 推奨
洗浄機器	マルチスクリーンバキュームマニホールド※ (イムコアカタログ番号: TP-5001) 推奨
機器、資材	ボルテックスミキサー プレートシェーカー マイクロ遠心機 1.5 mL マイクロチューブ プレートシール ピペット、チップ等

※洗浄方法として、96 穴のV 底プレートとプレート遠心機を用いたフリッキング洗浄も可能であるが、使用する場合は個々の試験所であらかじめ検証を行うこと。

4. 検体の調製

血清のみ使用可能である。EDTA 処理血清は使用しない。

検査前、すべての血清検体をボルテックスミキサーで混合し、短時間遠心（10,000×g で 30 秒）して使用する。

血清は 2～8℃で保管し、保管時間は 48 時間を超えないようにする。血清を 48 時間以上保管する場合には、-20℃ 以下で冷凍することで 2 年まで保管することができる。

血清を 2 年以上保管するためには、個々の試験所がその方法を確立し検証する必要がある。

血清検体の解凍、凍結は繰り返し行わない。

5. 検査手順

試薬と検体の準備

1. C3d 陽性コントロールビーズ、補体含有ヒト血清および標識 C3d 抗体を冷凍庫から取り出し、室温暗所に保管して解凍する。

LSA ビーズ（LSA Class I あるいは Class II Bead Mix）も同様に冷凍庫から取り出し、室温暗所に保管して解凍する。解凍したら直ちに氷の上に置き、遮光する。

2. 洗浄液は使用前に室温（20～24℃）に戻す。

他の構成試薬は、必要時まで 2～8℃の暗所に保管する。

血清検体およびコントロール血清のフィルタープレート上での位置を割り当てる。

陽性コントロール血清と陰性コントロール血清は、LIFECODES LSA 製品のキットに含まれているものを使用する。最初のウェルに陰性コントロール血清、2 番目に陽性コントロール血清、3 番目以降に検体の順番を推奨する。

※陰性コントロール血清は、C3d の結果判定に使用するため、必ず加える。

プレートの準備

3. 割り当てられていないウェルを粘着性プレートシールで覆う。それから、使用するウェルに 100～300 μL の蒸留水を加えて湿らせる。2-5 分間インキュベーション後、バキュームマニホールドで静かに吸引して水分を除去する。

C3d 含有 LSA ビーズミックスの調製

4. C3d 陽性コントロールビーズと LSA ビーズのバイアルを 600~800×g で 30 秒間遠心し、ビーズをバイアルの蓋や側壁から取り除く。別のマイクロチューブに、1 検体当たり 1 μL の C3d 陽性コントロールビーズと 40 μL の LSA ビーズの割合で、C3d 含有 LSA ビーズミックスを調製する。
ピペティングによる量損失を考慮に入れ、1 検体分ほど余計に調製することを推奨する。調製したビーズミックスが均等に浮遊するように、使用前に 1 分間ボルテックスする。

試薬と検体の分注と反応

5. 40 μL の C3d 含有 LSA ビーズミックスを割り当てられている各ウェルに加える。
分注に時間がかかる場合は C3d 含有 LSA ビーズミックスのバイアルを 2 分ごとにボルテックスをかけ直し、ビーズが浮遊した状態を保つ。
さらに 10 μL の血清およびコントロール血清を加え混合する。
6. 粘着性プレートシールでプレートを覆い、ホイルあるいは箱で遮光する。
プレートシェーカー(200 回転/分に設定)にプレートをセットして、室温(20~24°C)で 30 分インキュベートする。
未使用のコントロール血清は、2~8°Cの暗所で再び保管する。
未使用の C3d 陽性コントロールビーズおよび LSA ビーズミックスは、-65°C以下の暗所で再び保管する。

補体血清の分注

7. 30 分のインキュベーション後、粘着性プレートシールを外し、陰性コントロール血清のウェルも含め、各ウェルに 30 μL の補体含有ヒト血清を加える。
粘着性プレートシールでプレートを覆い、ホイルあるいは箱で遮光する。プレートシェーカーにプレートをセットして、室温(20~24°C)で 30 分インキュベートする。

プレートの洗浄

8. 30 分のインキュベーション後、粘着性プレートシールを外し、100 μL の洗浄液を各ウェルに加える。プレートの側面を軽くたたいて混合し、それからプレートを静かに吸引除去する。

※過度の吸引に気を付ける。吸引力が強すぎる場合、ビーズが膜に付着し、測定に不具合を引き起こすおそれがある。

9. 250 μ L の洗浄液を各ウェルに加え、吸引除去する。さらに 3 回この操作を繰り返し、合計 4 回洗浄する。

※洗浄が十分でない場合、標識 C3d 抗体が抗原抗体複合体に結合した C3d を検出する能力が低下し、偽陰性の結果を生じることがある。

標識抗体の分注と反応

10. 標識 C3d 抗体のバイアルを 600~800 \times g で 30 秒間遠心し、溶液をバイアルの蓋や側壁から取り除く。標識 C3d 抗体は調製済みのため、希釈する必要はない。 50 μ L の標識 C3d 抗体を各ウェルに加える。
粘着性プレートシールでプレートを覆い、ホイルあるいは箱で遮光する。プレートシェーカーにプレートをセットして、室温（20~24 $^{\circ}$ C）で 30 分インキュベートする。

プレートの洗浄

11. 30 分のインキュベーション後、粘着性プレートシールを外し、100 μ L の洗浄液を各ウェルに加える。プレートの側面を軽くたたいて混合し、それからプレートを静かに吸引除去する。
12. 250 μ L の洗浄液を各ウェルに加え、吸引除去する。

Luminex 測定

13. 200 μ L の洗浄液を各ウェルに加える。軽くピペッティングして混和し、ビーズを再度浮遊させる。
14. メーカー推奨事項に従い、Luminex 装置でデータを収集する。
データ収集の遅延が 3 時間を超える場合、偽陽性や偽陰性となる可能性が増加する。
未使用の洗浄液は、2~8 $^{\circ}$ C で再び保管する。

6. 結果判定

Luminex 測定結果から得られる MFI(蛍光強度)から、3 種類の補正值(BG Adjusted、BCG-Neg、R-Strength) を算出して C3d 陽性かどうかを判断する。

それぞれのビーズの MFI から陰性コントロール血清の MFI (NC 血清の MFI)を引いて、BG Adjusted (バックグラウンド調整 MFI) を算出する。

$$\text{BG Adjusted} = \text{サンプルの MFI} - \text{NC 血清の MFI}$$

この BG Adjusted MFI を、そのローカスの最低ランク抗原 (LRA) の MFI で割って、BCR-Neg (バックグラウンド補正比) を算出する。

$$\text{BCR-Neg} = \text{サンプルの BG Adjusted MFI} / \text{最低ランク抗原 (LRA) の MFI}$$

抗原の BG Adjusted MFI を、陰性コントロール (NC) 血清の抗原の MFI で割って、R-Strength (相対強度) を算出する。

$$\text{R-Strength} = \text{サンプルの BG Adjusted MFI} / \text{NC 血清の MFI}$$

3 種類のうち 2 つ以上の補正值がカットオフ値を上回る場合、C3d 陽性ビーズと判断する。カットオフ値については、ロットごとに定められている。カットオフ値を調整することで、感度を高めたり弱めたりできる。

C3d detection 判定例

Raw Value	BG Adjusted	BCR-Neg	R-Strength	Assignment	DR/DRS	DQA	DQB
251	2773	48.65	79.23	Positive		DQA1*02:01	DQB1*03:02
NC	35	0	0.00	Negative		DQA1*02:01	DQB1*03:02

ID 251 (DQA1*02:01/DQB1*03:02) の判定 ⇒ Positive
 BG Adjusted = 2808 - 35 = 2773 ≥ カットオフ : 1500 Positive
 BCR- Neg = 2773 / 57 = 48.65 ≥ カットオフ : 4 Positive
 R- Strength = 2773 / 35 = 79.23 ≥ カットオフ : 4 Positive

最終的な補体結合性の判断は、LSA アッセイの結果と組み合わせる。

LSA アッセイの結果判定は、LSA 参考プロトコルを参照のこと。

C3d アッセイと LSA アッセイは、必ずしも同時に行う必要はない。

C3d 陽性の解釈

✓C3d ビーズ陽性 かつ LSA ビーズ陽性 (IgG 陽性)

より高い確率で、補体結合能力が高い IgG 抗体が存在している。

※C3d アッセイと LSA アッセイ結果がともに陽性のビーズのみ、C3d 陽性と判断する。

C3d 陰性の解釈

✓C3d ビーズ陰性 かつ LSA ビーズ陽性 (IgG 陽性)

補体結合能力が低い IgG 抗体が存在している。

IgG が存在してもそれは必ずしも補体経路が活性化されるものではない。

✓C3d ビーズ陽性 かつ LSA ビーズ陰性 (IgG 陰性)

IgM 抗体ポジティブで DTT 処理を行っていない場合、サンプルは補体を活性化するため、C3d を生成するが IgG はネガティブの可能性はある。

✓C3d ビーズ陰性 かつ LSA ビーズ陰性 (IgG 陰性)

IgG 抗体が存在していない。

7. 結果判定の注意点

✓陽性コントロール血清は、多数の LSA ビーズに反応し、ロットごとのデータシートに記載されているものと同様のパターンを示す。陰性コントロール血清は、LSA ビーズがあっても反応しない。

✓C3d 陽性コントロールビーズは、陰性コントロール血清を用いて測定すると、MFI は 10,000 以上になる。MFI が 10,000 より低値の場合は、C3d コンジュゲートの添加量が少ない、洗浄が不十分、または C3d コンジュゲートがコンタミネーションを起こした可能性がある。

✓患者検体に存在する免疫複合体あるいは他の免疫グロブリン凝集は、非特異的結合を増加させ、本検査において誤った結果を導くことがある。HLA 試験は複雑であり、また複数の因子が C3d を形成させる補体カスケードに影響するため、適格な検査者が全ビーズの結果を考慮に入れて結果の解釈を行う必要がある。

- ✓血清抗体価は患者および時点に固有のものである。多くのビーズで MFI が 15,000 を超えた場合、血清の希釈が有効な場合がある。
- ✓再検査の基準は設定されていないが、目安として各ローカスの LRA の MFI が 500 以上の場合は、結果を注意深く解釈する必要がある。LIFECODES 血清クリーナーによる処理後の検体で再検査を行うと、バックグラウンドが低下する場合がある。

LIFECODES 血清クリーナーは、Luminex アッセイにおけるヒト血清成分の非特異的な結合に起因した、一部の血清に見られる高バックグラウンドシグナルを低減することを目的とした試薬である。

LIFECODES 血清クリーナーを使用した検体処理

1. LIFECODES 血清クリーナービーズを十分にボルテックスして混合する。
2. 新しいマイクロチューブに、4 μ L の LIFECODES 血清クリーナービーズと 20 μ L の血清を分注し、30 秒間ボルテックスする。
3. ローテーター上で室温にて 30 分間混和する。
4. 処理した血清を 15,000 \times g で 3 分間遠心し、LIFECODES 血清クリーナービーズを沈殿させる。
5. 沈殿を崩さないように注意しながら、新たなマイクロチューブに 12.5 μ L の処理した血清を移す。

※より多く血清の量を処理する場合は、LIFECODES 血清クリーナービーズと血清量をそれぞれ均等の比率で増加させること。