

---

QCWS 参考プロトコル  
抗HLA 抗体検査  
(LIFECODES LifeScreen Deluxe (LMX))

---

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

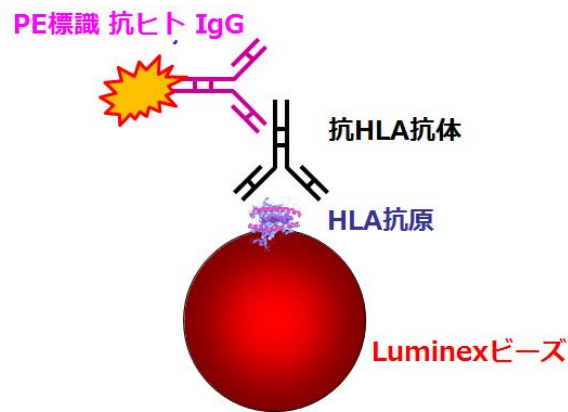
目次

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 .....	5
7. 結果判定の注意点.....	7

## 1. 概要と説明

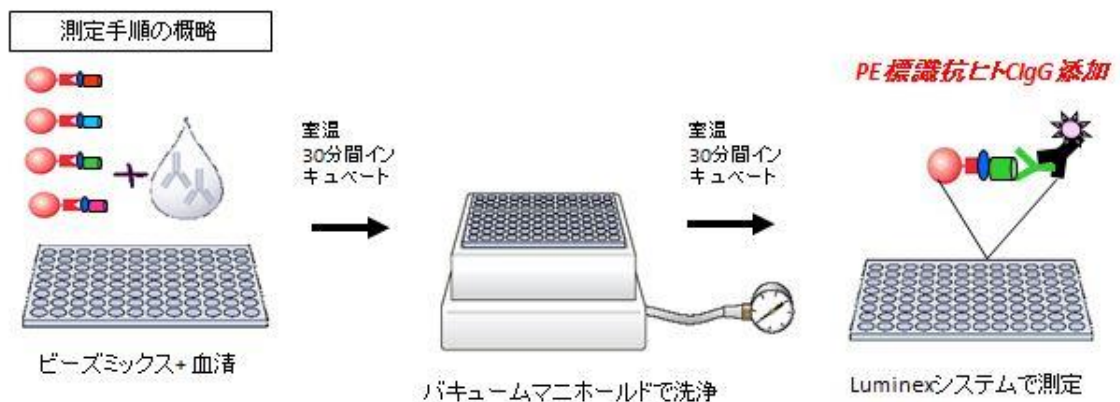
LIFECODES LifeScreen Deluxe (LMX) は、Luminex システムを使用して検体(血清)中の抗 HLA 抗体を検出するための研究用試薬である。

LIFECODES LifeScreen Deluxe ビーズは、HLA クラス I 及び HLA クラス II に対する IgG 抗体を検出するように設計されている。LifeScreen Deluxe はアフィニティー精製した HLA クラス I 及び HLA クラス II 糖タンパク質を結合した Luminex ビーズで構成されている。



## 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。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 IgG 抗体を加える。室温でインキュベーション後、検体を希釈して Luminex 装置で分析する。各ビーズのシグナル強度を使用して、結合した抗 HLA 抗体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
LifeScreen Deluxe Beads (HLA ビーズ)	480 $\mu$ L	2~8°Cで暗所保管
Conjugate Concentrate (標識抗体濃縮液)	550 $\mu$ L	2~8°Cで暗所保管
Wash Buffer (洗浄液)	150 mL	2~8°Cで保管
Positive Control Serum (陽性コントロール血清)	80 $\mu$ L	2~8°Cで保管
Negative Control Serum (陰性コントロール血清)	80 $\mu$ 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 (写真左下) ※ (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 (写真右下) ※ (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 1.5-2.0 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

血清を使用して検査を行う。

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℃ 以下で凍結することで 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. 洗浄液を使用前に室温(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。

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 番目以降に検体を割り当てる順番を推奨する。

##### プレートの準備

2. 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。

##### 試薬と検体の分注と反応

3. HLA 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。ビーズ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。
4. 40 μL の洗浄液を割り当てられている各ウェルに加え、その後 12.5 μL の血清あるいはコントロール血清を加え混合する。
5. 5 μL の HLA ビーズを各ウェルに加える。分注に時間がかかる場合は HLA ビーズのバイアルを 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。
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℃)

で 30 分インキュベートする。

未使用のコントロール血清や HLA ビーズは、2~8°Cの暗所で再び保管する。

7. 反応中に、別のマイクロチューブに、標識抗体濃縮液を洗浄液で希釈して希釈コンジュゲートを調製する。1 検体当たり 5  $\mu\text{L}$  の標識抗体濃縮液と 45  $\mu\text{L}$  の洗浄液の割合で希釈コンジュゲートを調製する。ピペッティングによる量損失を考慮に入れ、1 検体分ほど余計に希釈コンジュゲートを調製することを推奨する。使用するまでホイルで覆うか暗所に置くなどして室温で保管する。

未使用の標識抗体濃縮液は、2~8°Cの暗所で再び保管する。

#### 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  $\mu\text{L}$  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。

※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  $\mu\text{L}$  の洗浄液を各ウェルに加え、吸引除去する。さらに 2 回この操作を繰り返し、合計 3 回洗浄する。

※洗浄が十分でない場合、ビーズに結合した IgG をコンジュゲートが検出する能力が低下し、偽陰性結果を引き起こす可能性がある。

#### 標識抗体の分注と反応

10. 50  $\mu\text{L}$  の希釈コンジュゲート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°C）で 30 分インキュベートする。

#### Luminex 測定

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、150  $\mu\text{L}$  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。
12. 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°Cで再び保管する。

## 6. 結果判定

被検体が HLA クラス I あるいは HLA クラス II 特異的抗体陽性かどうかを決定するために、最初に個々の HLA ビーズが IgG 抗体陽性か陰性かを評価する。

個々の HLA ビーズが陽性かどうかを決定するため、3 種類の補正值 (Adj Val1、Adj Val2、Adj Val3) を計算する。最初に各ビーズの MFI (蛍光強度) を各陰性コントロールビーズ (CON1、CON2、CON3) の MFI で割る。この数値からさらに BAF (Background Adjustment Factor) を差し引く。BAF は個々のビーズとコントロールの組み合わせに対して事前に決定された MFI の比率で、ビーズのバックグラウンドノイズを補正する。ロットごとに BAF の値は定められている。

$$\frac{\text{各ビーズの MFI}}{\text{陰性コントロールビーズ 1 (CON1) の MFI}} - \text{BAF} = \text{Adj Val1}$$

$$\frac{\text{各ビーズの MFI}}{\text{陰性コントロールビーズ 2 (CON2) の MFI}} - \text{BAF} = \text{Adj Val2}$$

$$\frac{\text{各ビーズの MFI}}{\text{陰性コントロールビーズ 3 (CON3) の MFI}} - \text{BAF} = \text{Adj Val3}$$

算出された補正值がプラスの場合を Score=1 とする。0 未満の場合を Score=0 とする。3 種類の補正值の Score を合計し、合計 Score の数値から陽性ビーズ反応であるかを判定する。合計 Score は 0 から 3 の数値を示す。

- ✓ プローブ CI-01 とプローブ CII-01 の場合、合計 Score が 1 以上 (3 種類の補正值のうち 1 つ以上がプラス) ならば、陽性ビーズ反応であることを示す。
- ✓ その他のビーズの場合、合計 Score が 2 以上 (3 種類の補正值のうち 2 つ以上がプラス) ならば、陽性ビーズ反応であることを示す。
- ✓ 合計 Score が 0 (全ての補正值が 0 以下) ならば、陰性ビーズ反応であることを示す。



補正值計算とプローブ（CII-01）判定例

Class I Assignment: Negative    Class II Assignment: Positive

Raw	CI-01	CI-02	CI-03	CI-04	CI-05	CI-06	CI-07	CII-01	CII-02	CII-03	CII-04	CII-05	Pos Ctl / CONs
Raw	606	1414	503	870	814	802	570	1823	273	832	8496	11668	22061
Adj Val1	-1.19	1.81	-1.28	-0.22	0.07	-0.54	-1.48	3.02	-1	-2.9	30.38	41.2	249
Adj Val2	-3.42	-2.63	-2.96	-3.22	-2.77	-3.52	-3.51	-3.24	-7.4	-4.57	6.86	9.68	748
Adj Val3	-2.09	-5.42	-1.76	-1.62	-1.17	-1.81	-2.16	-0.37	-2	-3.52	11.85	18.4	501
Score	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3	3	

CON1:249  
CON2:748  
CON3:501

BAF  
CON1: 4.298  
CON2: 5.676  
CON3: 4.008

**CII-01 の判定 ⇒ 合計 Score = 1 ⇒ Positive**  
 Adj Val1 = (1823/249) - 4.298 = 3.02 > 0 ⇒ Score = 1  
 Adj Val2 = (1823/748) - 5.676 = -3.24 < 0 ⇒ Score = 0  
 Adj Val3 = (1823/501) - 4.008 = -0.37 < 0 ⇒ Score = 0

被検体の HLA クラス I あるいは HLA クラス II 特異的抗体陽性であるかどうかの総合判定は、次のようになる。

- ✓7種のHLAクラスIビーズ（CI-01～CI-07）のうち少なくとも1つが陽性の場合、検体はHLAクラスI特異抗体が陽性であると考えられる。
- ✓5種のHLAクラスIIビーズ（CII-01～CII-05）のうち少なくとも1つが陽性の場合、検体はHLAクラスII特異抗体が陽性であると考えられる。
- ✓全てのHLAビーズが陰性の場合、検体はHLA特異的IgG抗体が陰性であると考えられる。

LifeScreen Deluxe 総合判定例

Class I Assignment: Negative    Class II Assignment: Positive

Raw	CI-01	CI-02	CI-03	CI-04	CI-05	CI-06	CI-07	CII-01	CII-02	CII-03	CII-04	CII-05	Pos Ctl / CONs
Raw	606	1414	503	870	814	802	570	1823	273	832	8496	11668	22061
Adj Val1	-1.19	1.81	-1.28	-0.22	0.07	-0.54	-1.48	3.02	-1	-2.9	30.38	41.2	249
Adj Val2	-3.42	-2.63	-2.96	-3.22	-2.77	-3.52	-3.51	-3.24	-7.4	-4.57	6.86	9.68	748
Adj Val3	-2.09	-5.42	-1.76	-1.62	-1.17	-1.81	-2.16	-0.37	-2	-3.52	11.85	18.4	501
Score	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3	3	

• CI-01~CII-05 : ビーズ名  
 • Raw: MFI値  
 • Adj Val1~Val3: 補正值  
 • Score: Adj Val1 + Adj Val2 + Adj Val3

**Class I の総合判定 ⇒ Negative**  
 CI-01 の Score が1未満 : Negative  
 CI-02, CI-03, CI-04, CI-05, CI-06, CI-07 の Score が2未満 : Negative

**Class II の総合判定 ⇒ Positive**  
 CII-01 の Score が1以上 : Positive  
 CII-02, CII-03 の Score が2未満 : Negative  
 CII-04, CII-05 の Score が2以上 : Positive

## 7. 結果判定の注意点

- ✓陽性コントロールビーズは常に 10,000 以上の MFI を示す必要がある。10,000 未満の MFI となった場合、その検査は洗浄が不十分であるか、コンジュゲートが損なわれている可能性がある。
  
- ✓3 種類の陰性コントロールビーズ (CON1、 CON2、 CON3) の MFI の参考範囲はロットごとのデータシートに記載されている。陰性コントロールビーズの MFI は、アッセイのバックグラウンドの目安を示している。この範囲を外れた場合でも判定結果が否定されるものではないが、注意深く結果を解釈する必要がある。陰性コントロールビーズのバックグラウンドが高い場合、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、低下する場合がある。
  
- ✓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 試験は複雑なため、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。

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  $\mu$ L の LIFECODES 血清クリーナービーズと 20  $\mu$ 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  $\mu$ 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。