

---

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

---

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

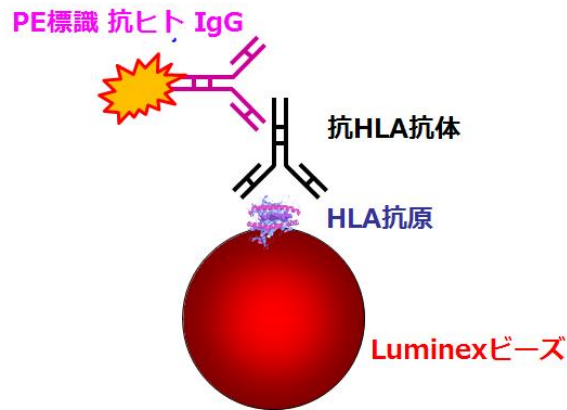
1. 概要と説明 .....	1
2. 測定原理 .....	1
3. キット内容および必要機器.....	2
4. 検体の調製 .....	3
5. 検査手順 .....	3
6. 結果判定 .....	5
7. 結果判定の注意点.....	6

## 1. 概要と説明

LIFECODES LSA 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。

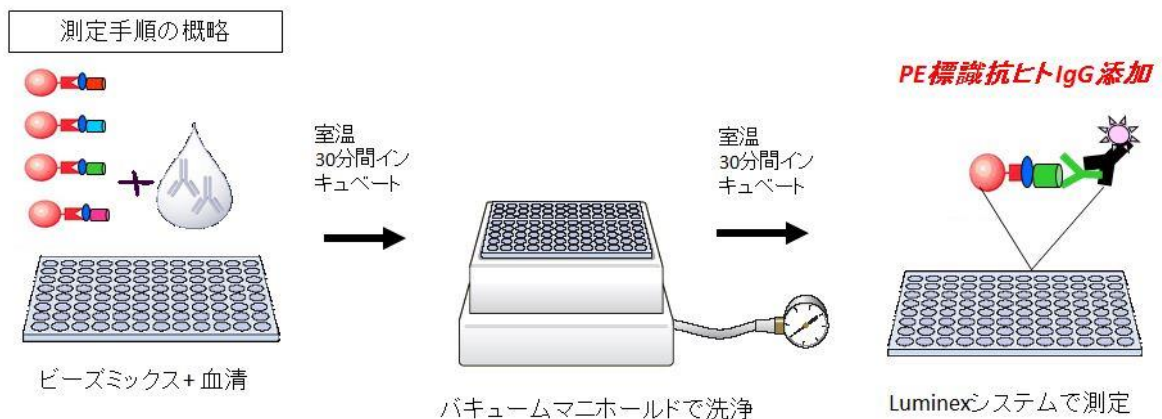
LIFECODES LSA Class I ビーズは、HLA クラス I 糖タンパク質に対する IgG 抗体を検出するように設計されている。LSA Class I は、異なる個体に由来する精製した recombinant HLA クラス I 糖タンパク質が結合した異なる Luminex ビーズで構成されている。

LIFECODES LSA Class II ビーズは、HLA クラス II 糖タンパク質に対する IgG 抗体を検出するように設計されている。LSA Class II は、異なる個体に由来する精製した recombinant HLA クラス II 糖タンパク質が結合した異なる 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
LSA Beads ※ (LSA ビーズ)	960 $\mu$ L	-65°C以下で暗所保管
Conjugate Concentrate (標識抗体濃縮液)	120 $\mu$ L	2~8°Cで暗所保管
Wash Buffer (洗浄液)	30 mL	2~8°Cで保管
Positive Control Serum ※ (陽性コントロール血清)	100 $\mu$ L	2~8°Cで保管
Negative Control Serum ※ (陰性コントロール血清)	100 $\mu$ L	2~8°Cで保管

※クラス I およびクラス II で内容は異なる。

## 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 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. LSA ビーズミックスを冷凍庫から取り出し、室温暗所に保管して解凍する。  
解凍したら氷上に置き遮光する。  
※ビーズミックスは少なくとも 6 回は性能に影響なく凍結と解凍を行うことができる。
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。  
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

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  $\mu\text{L}$  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

4. 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。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。
5. 40  $\mu\text{L}$  の LSA ビーズ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 LSA 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。さらに 20  $\mu\text{L}$  の血清およびコントロール血清（プロトコル 2）を加え混合する。

※検査に使用する血清量について

現在のLSAのプロトコルでは、10  $\mu\text{L}$  の血清（プロトコル1）あるいは20  $\mu\text{L}$  の血清（プロトコル2）が使用可能である。将来はプロトコル2に統一される予定のため、使用する血清は20  $\mu\text{L}$ （プロトコル2）を推奨する。

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℃）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℃の暗所で再び保管する。  
未使用のLSA ビーズミックスは、-65℃以下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℃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載せるか、5～10分おきにボルテックスで静にかき混ぜる。プレートシェーカーにプレートをセットして、室温（20～24℃）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、130~150  $\mu$ L の洗浄液を各ウェルに加える。軽くピペ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

各ビーズの①MFI (蛍光強度) と MFI を最低ランク抗原 (LRA) ビーズの MFI で割った②補正值 (MFI/LRA) を用いて陽性か陰性かを判断する。①と②がともにカットオフ値を上回る  
とき、陽性ビーズと判断する。

- ①  $MFI \geq$  カットオフ値
- ②  $MFI/LRA \geq$  カットオフ値

カットオフ値は、ロットごとに定められている。

各ローカスの LRA の MFI 値は、そのローカスの最低ランク抗原ビーズの MFI 値である。

## LSA 総合判定例

Patient Name: Ex1-#02    HLA Type:    Lot ID: 3005161 3005159-SA    Run Date: 08.30.17  
 Reactivity Adjustments    Groupings    History    Print Reports  
 Antigen Adjustment: 0    MFI Cutoff: 0    Lowest DR: 40    Negative CON: 112    0 - 499    3000  
 MFI Threshold: 750    Use MFI Cutoff    Lowest DQ: 75    Positive CON: 11853    500 - 999    5000  
 Lowest DP: 59    PRA: 10    1000 - 2999    > 10  
 Cutoffs    Control Values    MFI Ranges

Antigen ID	Cut-off	Raw Value	MFI/LRA	Assignment	DR/DRSs	DQA	DQB
251	3.90	7142	95.23	Positive		DQA1*02:01	DQB1*03:02
254	4.00	6980	93.07	Positive		DQA1*02:02	DQB1*03:03
253	3.90	6418	85.57	Positive		DQA1*03:02	DQB1*03:02
255	3.92	6001	80.01	Positive		DQA1*04:01	DQB1*03:03
252	3.84	5972	79.63	Positive		DQA1*03:01	DQB1*03:02
256	3.77	5611	74.81	Positive		DQA1*06:01	DQB1*03:03

**ID251 (DQA1\*02:01/DQB1\*03:02) の総合判定  $\Rightarrow$  Positive**  
 $MFI = 7142 \geq$  カットオフ: 750 Positive  
 $MFI/LRA = 7142 / 75 = 95.23 \geq$  カットオフ: 3.90 Positive



## 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 ビーズとほとんど反応せず、通常 MFI は 1,000 より小さくなる。
- ✓陽性コントロールビーズはコントロール血清による MFI は 10,000 以上となる必要がある。コントロール血清で 10,000 を下回る値となった場合、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。陰性コントロールビーズは、低い MFI を示す。コントロールビーズの測定限界については、ロットごとのデータシートに記載されている。
- ✓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。
- ✓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、IgG 抗体の検出を向上させるため、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  $\mu$ 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。