
QCWS 参考プロトコル

クロスマッチ

+

平成 31 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
クロスマッチ WG

日本移植学会 移植関連委員会

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	平成 年 月 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
	平成 年 月 日		

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. 検査の準備	1
1.1 検査機器の準備	1
1.2 検体の処理	1
1.3 検査の手順	2

1. 検査の準備

1.1 検査機器の準備

1.1.1 検査器具・資材の準備

機器	フローサイトメーター 遠心分離機 超低温フリーザー
器具・資材	ACD-A 液入り採血管 ミネラルオイル チューブ(機器指定の専用品) ピペット、チップ タイマー 96 穴テラサキプレート(96 ウェルミニプレート)

1.2 検体の処理

1.2.1 ドナーリンパ球の細胞採取

クロスマッチで使用するドナーリンパ球の採取。

- ① ドナー血液は ACD-A 液入り採血管を推奨する。
- ② 採血後、速やかに細胞採取を行う。(採血した血液は室温保存)
- 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。
- ④ リンパ球分離は以下の方法等を用いる。
 - ④-1 免疫磁気ビーズ法
 - ④-2 比重遠心法 *各採取方法については、使用する試薬の添付文章を参照の事。

1.2.2 レシピエント血清の処理

- ① 血清を凍結し融解する。(-80℃)
- ② 融解後は、しっかり転倒混和後に超遠心を行う。
- ③ 遠心後の血清は、上層、下層および壁面に凝固物が存在する可能性があるため、慎重に中間から検体を回収して使用する。

1.3 検査の手順

1.3.1 Complement dependent cytotoxicity (CDC) 補体依存性細胞傷害
= Lymphocyte cytotoxicity test (LCT) リンパ球細胞傷害試験

- ① 採取したドナーリンパ球 (Tリンパ球、Bリンパ球) を $2.0\sim 3.0\times 10^3/\mu\text{l}$ 程度に調整する。
- ② 96 穴テラサキプレートを用意し、ウェルにミネラルオイルを $5\mu\text{l}$ 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 $1\mu\text{l}$ 分注する。
- ⑤ Bリンパ球用トレイに、ドナーBリンパ球を $1\mu\text{l}$ 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 $5\mu\text{l}$ 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 $5\mu\text{l}$ 分注する。(エオジン染色も可)
- ⑩ 鏡検

検査結果判定

- 全細胞に占める死細胞の%をカウントし、陰性コントロールよりも 11%以上を陽性とする。

死細胞率 (%)	Score	判定
0-10%	1	陰性
11-20%	2	弱陽性 (疑陰性)
21-50%	4	陽性
51-80%	6	陽性
81-100%	8	陽性 (強陽性)
	0	判定不能

1.3.2 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 試験管にコントロール血清(陰性、陽性)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, PBS 等を分注し、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, PBS 等を分注し、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

検査結果判定

- 各リンパ球の取り込みは、10,000 個以上が望ましい。
- 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; MCFI) の比 (Ratio) を算出し、判定する。
- 陽性判定基準は施設毎に決定し、目安として陰性血清の MCFI の 2~3SD 以上とする。