

添付文書

FLOWPRA® SCREENING TEST*

HLA Class I および Class II 抗原に対するパネル反応性抗体（PRA）の検出を目的としたフローサイトメトリー用試薬

体外診断用(日本では研究用試薬)

表 1 FlowPRA®製品

| カタログ番号 | 製品名 | 内容 |
|---------|---|--|
| FL1-30 | FlowPRA® Class I Screening Test (50 テスト用) フローサイトメトリーによる HLA Class I IgG 抗体の検出を目的とした、異なる精製 HLA Class I 抗原でコーティングされた 30 種類のマイクロビーズを含むパネル抗原プール | 1. FlowPRA® I ビーズ 2. Wash Buffer: 26 mL、10 × buffer 3. FITC conjugated F(ab') ₂ anti-human IgG Fcγ fragment specific: 60 μL、100 × |
| FL2-30 | FlowPRA® Class II Screening Test (50 テスト) フローサイトメトリーによる HLA Class II IgG 抗体の検出を目的とした、異なる精製 HLA Class II 抗原でコーティングされた 30 種類のマイクロビーズを含むパネル抗原プール | 1. FlowPRA® II ビーズ 2. Wash Buffer: 26 mL、10 × buffer 3. FITC conjugated F(ab') ₂ anti-human IgG Fcγ fragment specific: 60 μL、100 × |
| FL12-60 | FlowPRA® Class I and II Screening Tests (50 テスト) フローサイトメトリーによる HLA Class I および II IgG 抗体の同時検出を目的とした、各 30 種類のマイクロビーズを含む 2 つのパネル抗原プール。パネル 1 は異なる精製 HLA Class I 抗原で、パネル 2 は異なる精製 HLA Class II 抗原でそれぞれコーティングされています。 | 1. FlowPRA® I ビーズおよび Flow PRA™ II ビーズ 2. Wash Buffer: 26 mL、10 × buffer 3. FITC conjugated F(ab') ₂ anti-human IgG Fcγ fragment specific: 60 μL、100 × |
| FL1-PC | Class I Positive Control Serum | 240 μL、10 テスト |
| FL2-PC | Class II Positive Control Serum | 240 μL、10 テスト |
| FL-NC | Negative Control Serum | 240 μL、10 テスト |

使用用途

FlowPRA® Screening Test は、フローサイトメトリー技術による臓器移植前後のレシピエント血清における HLA 特異抗体の検出を目的としています。

製品の概要および説明

FlowPRA® ビーズは精製 HLA 抗原でコーティングされたマイクロビーズ（直径 2~4 μm）であり、FlowPRA® Screening Test は FlowPRA® ビーズのパネルを用いて、HLA に対するパネル反応性抗体（PRA）をフローサイトメトリーでスクリーニングするために設計されています。

妊娠、輸血、または過去の臓器移植によって HLA に感作されたことのあるヒトでは、HLA に対する抗体が産生される場合があります。これまでの研究から、移植ドナーの臓器に対する HLA IgG 抗体が産生されている患者では臓器移植は禁忌であることが示されています（1~4）。一方、抗

* 米国特許第 5,948,627 号および第 6,150,122 号

HLA IgM 抗体および非 HLA 抗体は、移植における禁忌ではありません (5)。従来、PRA はリンパ球の細胞障害性でスクリーニングされていましたが (6)、現在ではフローサイトメトリー法によって抗体を高感度で検出できることが確認されています (7)。さらに、フローサイトメトリー法では抗 IgG 二次抗体を用いることで抗 IgG 抗体と抗 IgM 抗体を容易に区別でき (7)、非補体結合抗体の検出も可能です。

フローサイトメトリー法による PRA 試験には脾臓細胞プールが用いられていましたが (10)、すべての特性を発現した凍結細胞パネルの作製は困難です。さらに、脾臓細胞上には非 HLA 抗原も発現しており、HLA 抗体と非 HLA 抗体の区別は困難です。

従来、Class II 抗体の存在は、一般に B リンパ球陽性反応および T リンパ球陰性反応によって間接的に規定されていました。そのため、血清が Class I および Class II 抗体を両方含む場合には、Class II 抗体を明確に規定できませんでした。さらに、多くの脾臓細胞は T 細胞および B 細胞マーカーを発現しており、抗体が Class I 抗原と Class II 抗原のどちらに反応しているかを決定することは困難でした。

ここに紹介する The FlowPRA[®] Screening Test は、これらのすべての問題を解決し、さらに以下の利点を持っています：

1. 標準的細胞障害試験および従来のフローサイトメトリー法では、非 HLA 抗原に由来する偽陽性反応が問題となりましたが、FlowPRA[®] ビーズは精製 HLA 抗原でコーティングされているため、非 HLA 抗原に対する反応が除外されています。
2. FlowPRA[®] I ビーズは 30 種類の Class I ビーズのプール、FlowPRA[®] II ビーズは 30 種類の Class II ビーズのプールを含みます。それぞれの FlowPRA[®] ビーズは異なる精製 HLA Class I または Class II 抗原でコーティングされています (これらのパネルにおける HLA の頻度については FlowPRA[®] ビーズのデータシートを参照してください)。プールにはすべてのコモン HLA 抗原に加えて多くのレア HLA 抗原が含まれています。%PRA は、血清と陽性反応を示したビーズの割合で表されることから、FlowPRA[®] ビーズを用いることで陽性または陰性 PRA に限らず、%PRA のスクリーニングテストを行うことができます。
3. FlowPRA[®] test では、HLA Class I および Class II 抗体の同時検出、ならびに Class II 抗体と Class I 抗体の識別が可能です。FlowPRA[®] I ビーズは HLA Class I 抗体と特異的に反応し、HLA Class II 抗体とは交差反応しません。一方、FlowPRA[®] II ビーズは HLA Class II 抗体と特異的に反応し、HLA Class I 抗体との交差反応はありません。FlowPRA[®] I および FlowPRA[®] II ビーズの操作方法は同様です。さらに、Class I および Class II ビーズは蛍光特異性が異なり、フローサイトメーターで認識できるため、FlowPRA[®] I および II ビーズを混和し、1 本のチューブで Class I および Class II スクリーニングを行うことができます。
4. FlowPRA[®] は極めて感度が高いスクリーニングテストです。FlowPRA[®] test は CDC/AHG テストよりも感度が高いことが示されています (11、12)。
5. FlowPRA[®] test の成績は再現性にも優れています (11、12)。

原理

FlowPRA[®] Screening Test は、ヒト血清中 PRA をフローサイトメトリー法で迅速に検出するための調整済試薬です。これらの各 FlowPRA[®] ビーズの反応性は、ヒトのアロ血清および特異的 HLA モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法によって確認されました。血清中の HLA 抗体は、FlowPRA[®] ビーズと特異的に反応します。FlowPRA[®] ビーズと血清をインキュベートした後、蛍光標識抗ヒト IgG 抗体で染色すると、抗 HLA IgG 陽性の血清では、陰性の血清に比較して蛍光強度のシフトが認められます。 %PRA は、血清に陽性反応を示したビーズの割合 (%) で表されます。

FlowPRA[®] I ビーズは非蛍光ビーズ、FlowPRA[®] II ビーズは蛍光ビーズです。FlowPRA[®] II ビーズは 488 nm で励起され、ピーク約 580 nm の蛍光を発生しますが、これらの波長はフィコエリトリン (PE) と類似しているため、FL2 チャンネルで検出できます。この特性によって、FlowPRA[®] I ビーズと FlowPRA[®] II ビーズを同時に操作しても両者を識別することが可能です。

サンプル解析のスタンダードとして、FlowPRA[®] Screening Test では陽性および陰性コントロール血清を毎回テストする必要があります。同一ロットの FlowPRA[®] ビーズおよびコントロール血清を用いた場合、陽性コントロール血清の反応率は一定でなければなりません。

試薬

A. 識別

表 1 を参照してください。

B. 警告または注意

1. 体外診断用（日本では研究用試薬）に限ります。
2. **警告：**FlowPRA[®] PRA テスト試薬には、保存料として 0.1% アジ化ナトリウム (NaN₃) が含まれています。酸性状態では、アジ化ナトリウムから極めて毒性の高いヒドラゾン酸が生成されます。配管内で爆発性の沈積物が生成するのを防ぐため、アジ化ナトリウムを含む試薬は、廃棄前に流水で希釈することが推奨されます。
3. **バイオハザードに関する警告：**すべての血液由来製品は感染の可能性があるものとして取り扱ってください。本製品に用いられているコントロール血清は現在の FDA 基準に適合する試験では陰性でしたが、現在の試験法ではヒト血液由来製品から感染性病原体が伝播しないことを完全に保証できません。
4. 詳細については製品安全データシートを参照してください

C. 使用説明書

輸送または保管中にバッファー塩が析出していた場合、使用時希釈の前に軽く熱を加えて再溶解してください。

D. 保管方法

1. 受領後、キットの箱を開封せずに使用時まで-80°C~-65°Cのフリーザーに保管してください。
製品は、この状態で保存期間内は安定です（箱に記載された有効期限を参照してください）。
2. 初回使用後および／または製品の解凍後は、試薬を2°C~5°Cに保管してください。
重要：一度解凍した FlowPRA[®]ビーズまたは FITC conjugated F(ab')₂ anti-human IgG は再凍結しないでください。
3. 解凍したビーズは、3 ヶ月、または有効期限が 3 ヶ月以内の場合はその有効期限まで 2°C~5°C に保管することができます。Wash Buffer または FITC conjugated F(ab')₂ anti-human IgG は、12 ヶ月、または有効期限が 12 ヶ月以内の場合はその有効期限まで 2°C~5°C に保管することができます。
4. FITC conjugated F(ab')₂ anti-human IgG は光の影響を受けるため、暗所に保存する必要があります。
5. 5 日以内に使用する場合は、Positive Control Serum および Negative Control Serum を 2°C~8°C（解凍後）で保管できますが、Positive Control Serum および Negative Control Serum は凍結融解を繰り返すと不安定になる可能性があります。そのため、試薬を 5 日以内に使用しない場合は分注して凍結するか、元の試薬バイアル（1×のみ）を再凍結し、-80°C~-20°C に保管してください。

E. 使用前に必要な精製または処置

下記の「使用法」を参照してください。

F. 不安定性に関する指示

なし。

機器の条件

- A. 製造元の推奨するスタートアップ法に従って、フローサイトメーターの調整およびクオリティコントロールを日常的に実施してください。
- B. お使いのフローサイトメーターにおけるビーズ集団の位置を特定するため、PBS 0.5 mL に FlowPRA[®] I または II ビーズ 5 µL を加えてコントロールテストを実施し、FSC ゲインを設定してください（図 1、2 および 4）。
 - **注：**ビーズは標準的リンパ球よりも小さいため、ビーズを視覚化するためには高めの FSC ゲインが必要となります。

- C. 試験日はサンプル解析前に陽性コントロールサンプルおよび陰性コントロールサンプルによるテストを実施してください。

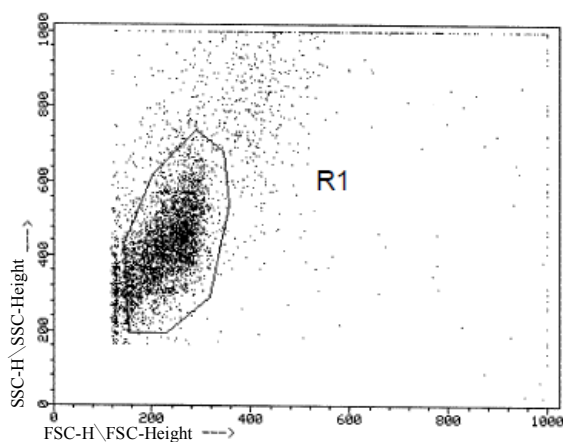


図 1 FlowPRA® I ビーズの FSC/SSC ドットプロットの例

検体の採取および準備

1. 新鮮血清または解凍済み血清を使用できます。凝集物が生じた場合はテスト前に遠心または濾過して除く必要があります。サンプル中のあらゆる凝集物または夾雑物によって、テスト結果が無効になる場合があります。
2. バックグラウンドが高くなる場合がありますので、検体血清の加熱による不活性化は行わないでください。

方法

A. 製品に含まれる試薬

製品内容については表 1 を参照してください。

B. キットの他に必要な試薬

固定液：0.5%ホルムアルデヒドを含む PBS（37%ホルムアルデヒド 1.35 mL を PBS 100 mL に加える）。

C. 操作手順

「使用法」を参照してください。

使用法

注：Class I または Class II 抗体を別個にスクリーニングする場合には、1 テストにつき 5 μ L の FlowPRA® Class I または Class II ビーズを使用してください。Class I または Class II 抗体を同時にスクリーニングする場合には、同量の FlowPRA® Class I または Class II ビーズを使用してください。2 種類のビーズをよく混和し、1 テストにつき 10 μ L を使用してください。

1. 使用前に FlowPRA[®] ビーズを vortex してください。
2. 1.5 mL のエッペンドルフチューブまたは 96 穴プレートにテスト血清 20 μ L と FlowPRA[®] Class I および／または Class II ビーズを入れ、穏やかに振盪しながら 20°C～25°C の暗所で 30 分間インキュベートします。
3. 蒸留水で 10 \times Wash Buffer を希釈し、1 \times 溶液を調製します。
4. 1 \times Wash Buffer を、チューブの場合は各 1 mL、96 穴プレートのウェルの場合は各 150 μ L 加えます。Vortex し、9,000 \times g 2 分間または、1,500 \times g 10 分間遠心分離します。上清をアスピレートし、除去します。
5. テストにチューブを使用する場合はステップ 4 を繰り返します。96 穴プレートを使用する場合は、200 μ L の Wash Buffer で 2 回洗浄してください。
6. 1 テストにつき 1 μ L の 100 \times FITC conjugated Goat anti-human IgG (Fc γ) を 1 \times Wash Buffer 99 μ L で希釈し、1 \times 溶液を調製します。
7. 1 \times FITC-conjugated Goat anti-human IgG (Fc γ) 100 μ L をビーズに加え、vortex します。穏やかに振盪しながら 20°C～25°C の暗所で 30 分間インキュベートします。
8. テストにチューブを使用する場合はステップ 4 を 2 回繰り返します。96 穴プレートを使用する場合は、100 μ L の Wash Buffer で 1 回、次に 200 μ L の Wash Buffer で 1 回、合計 2 回洗浄してください。
9. 1 \times 固定液を、チューブの場合は各 0.5 mL、96 穴プレートのウェルの場合は各 200 μ L 加えます。サンプルのフローサイトメーター解析の準備が整いました。すぐに測定しない場合は遮光して 2°C～5°C で 24 時間まで保存可能です。

データ取得

A. FlowPRA[®] I ビーズのみを使用する場合：

1. 各サンプル 5,000～10,000 イベントの緑色蛍光を測定します。
2. FSC/SSC ドットプロットにおける FlowPRA[®] I ビーズの主要集団にゲートをかけ（R1、図 1）、各サンプルの FL1 ヒストグラムを取得します。

B. FlowPRA[®] II ビーズのみを使用する場合：

1. 市販のコンペンセーション用ビーズまたは FlowPRA[®] I および II ビーズ、ならびに Class I Positive Control Serum および Negative Control Serum を用いて、以下の手順で蛍光コンペンセーションを行います。
 - a. FlowPRA[®] I test Class I Positive Control Serum および Negative Control Serum を解析します。Negative Control Serum と反応した FlowPRA[®] I ビーズをブランクビーズとして使用します。
 - b. FlowPRA[®] II ビーズ 5 μ L を PBS 0.5 mL で希釈します。
 - c. FL1 の高い方にシフトしたビーズが FL2 軸に沿ってブランクビーズと並ぶように、Positive Control Serum と反応した FlowPRA[®] I ビーズを用いて（FL2-%FL1）を調整し

ます。

- d. FlowPRA[®] II ビーズが FL1 軸に沿ってブランクビーズと並ぶように、FlowPRA[®] II ビーズの (FL1-%FL2) を調整します。
2. 蛍光強度およびゲート内のビーズ数を測定します：
- a. 各サンプル 5,000~10,000 イベントの緑色および黄色の蛍光を測定します。
 - b. FSC/SSC ドットプロット上で FlowPRA[®] II ビーズの主要な集団にゲートを設定し (R1、図 2)、FL2 ヒストグラムを取得します (図 3)。

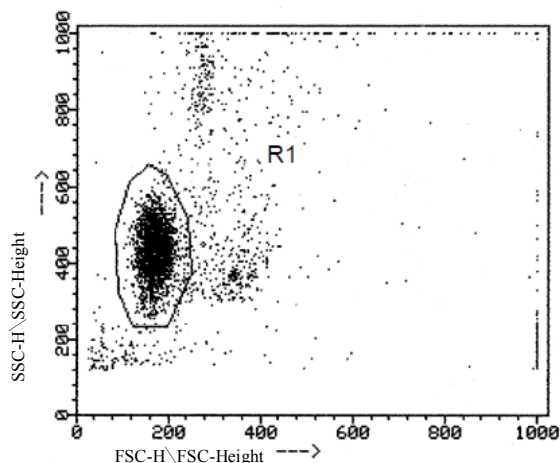


図 2 FlowPRA[®] II ビーズの FSC/SSC ドットプロットの例

- c. FL2 ヒストグラムで蛍光強度の高い集団にゲートを設定し (R2、図 3)、各サンプルについてゲートを設定した R1 (図 2) および R2 領域の FL1 ヒストグラムを取得します。

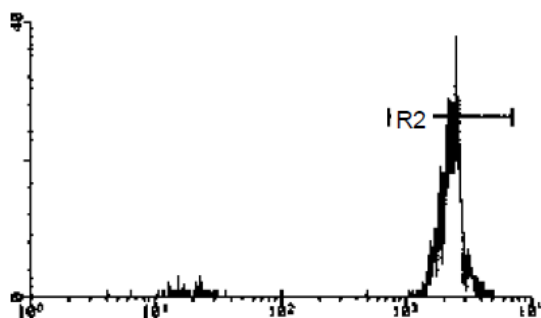


図 3 R1 領域にゲートを設定した FlowPRA[®] II ビーズの FL2 ヒストグラムの例

C. FlowPRA[®] I、FlowPRA[®] II およびコントロールビーズを用いる場合：

1. 市販のコンペンセーション用ビーズまたは FlowPRA[®] I および II ビーズ、ならびに Class I Positive Control Serum および Negative Control Serum を用いて、以下の手順で蛍光コンペンセーションを行います。
 - a. FlowPRA[®] I test Class I Positive Control Serum および Negative Control Serum を解析します。Negative Control Serum と反応した FlowPRA[®] I ビーズをブランクビーズとして使用します。
 - b. FlowPRA[®] II ビーズ 5 μ L を PBS 0.5ml で希釈します。
 - c. FL1 の高い方にシフトしたビーズが FL2 軸に沿ってブランクビーズと並ぶように、Positive Control Serum と反応した FlowPRA[®] I ビーズを用いて (FL2-%FL1) を調整します。
 - d. FlowPRA[®] II ビーズが FL1 軸に沿ってブランクビーズと並ぶように、FlowPRA[®] II ビーズの (FL1-%FL2) を調整します。
2. 蛍光強度およびゲート内のビーズ数を測定します：
 - a. 各サンプル 5,000~10,000 イベントの緑色および黄色の蛍光を測定します。
 - b. FSC/SSC ドットプロット上で FlowPRA[®] II ビーズの主要な集団にゲートを設定します (R1、図 4)。

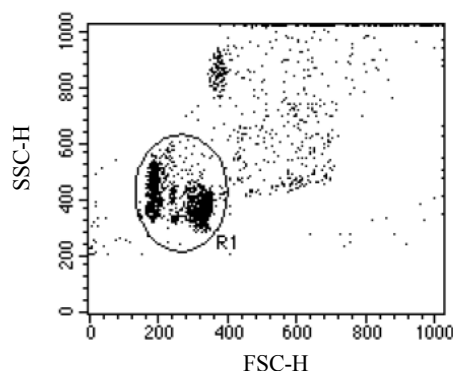


図 4 FlowPRA[®] I および FlowPRA[®] II ビーズの混合物のドットプロットの例

- c. R1 領域の FL2/FSC ドットプロットを取得します (図 5)。R2 は Class I ビーズのゲート、R3 は Class II ビーズのゲート、R4 は control ビーズのゲートです。Class I 解析に用いる R1 および R2 領域、Class II 解析に用いる R1 および R3 領域、および Control ビーズ解析に用いる R1 および R4 領域について、各サンプルの FL1 ヒストグラムを取得します。

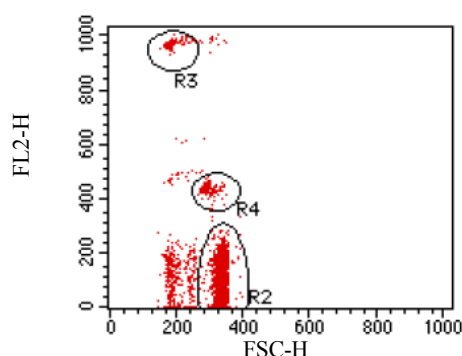


図 5 ClassI、ClassII、および Control ビーズの FL2/FSC ドットプロット

データ解析

- A.** FL1 ヒストグラムのカットオフ値の設定には、Positive Control Serum および Negative Control Serum を用います。Negative Control Serum には、HLA 抗体活性が含まれないことから、Negative Control Serum の FL1 ヒストグラムを陰性サンプルの基準として用いることができます。Positive Control Serum にはある程度の割合の HLA 抗体活性が含まれることから、蛍光強度のシフトが見られます（図 6、7）*。陽性および陰性のカットオフ値を Negative Control Serum の FL1 ヒストグラムにおけるピークの末端に設定し、Positive Control Serum のヒストグラムの同じ位置にカットオフ値のマーカを設定します（図 6、7）。陽性反応率は、カットオフ値の右にシフトしたイベントの割合で示されます。Positive Control Serum のデータシートを参照し、Positive Control Serum について期待される %PRA が得られていることを確認してください。Positive Control Serum の %PRA が予測値と一致しない場合は、アッセイ手順を確認するか、機器の設定を調整してください。Negative Control Serum は、フローサイトメーターのバックグラウンドノイズのため 1~7%の陽性シグナルを示すことがあります。しかし、2 本目のピークが認められる場合には、アッセイ手順または機器の設定が適切に行われていません。プロトコールを確認してください。

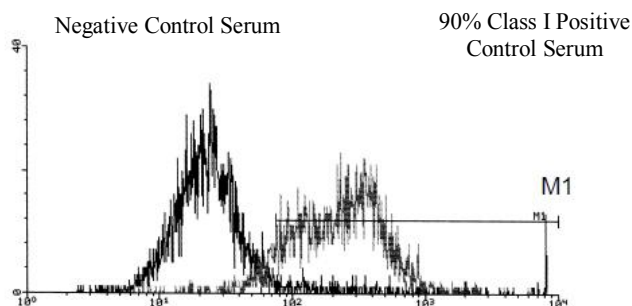


図 6 Becton Dickinson FACStar^{PLUS}®でオーバーレイした、ClassI Positive Control Serum に反応した FlowPRA[®]ビーズの FL1 ヒストグラムの例。注意：抗原パネルの現ロットに関する情報については、製品データシートを参照してください。

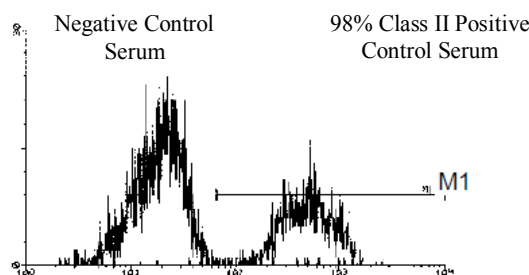


図 7 Class II Positive Control Serum および Negative Control Serum と反応した FlowPRA® II ビーズの R1 および R2 領域における FL1 のオーバーレイヒストグラムの例。注意：抗原パネルの現ロットに関する情報については、製品データシートを参照してください。

- B. FL1 ヒストグラム上で各テスト血清のヒストグラムにマーカーを設定する場合は、同一の陽性／陰性カットオフ値を用います。陽性反応率は、カットオフ値の右にシフトしたイベントの割合で示されます。
- C. 陽性の血清は、FL1 ヒストグラム上で単一ピークのシフトまたは複数のピークを示す場合があります。%PRA が 10%未満の場合は、ヒストグラムを詳細に観察してください。血清によっては、明らかな 2 本目のピークまたは陽性領域にショルダー状のピークが認められる可能性があります。これらの血清は陽性とみなします。陰性の血清は、通常単一ピークを示します。

結果

- A. FlowPRA® tests の結果が陽性の場合は、HLA 抗原に感作されたことを示しています。複数回の輸血または血小板輸血を受けた患者、もしくは経産女性の血清も陽性 PRA を示す場合があります。
- B. 健康な、輸血経験のない男性の血清は、陰性を示します。
- C. FlowPRA® tests は、HLA 特異的 IgG 抗体検出を目的としてデザインされているのに対して、従来の細胞障害試験では、補体活性化を介して細胞障害性を示す抗体がすべて測定されます。そのため、血清が非 HLA 抗体、非補体活性化 HLA 抗体、IgM および IgA HLA 抗体を含む場合には FlowPRA® test と細胞障害試験の結果が一致しない可能性があります。このような場合には、FlowPRA® test によってより特異的な結果が得られます。

方法の限界

- A. FlowPRA® test では、診断を目的とした IgG クラス抗体のみが検出されます（日本では研究用試薬）。研究を目的とする場合は、IgA または IgM に特異的な二次抗体（キットには含まれません）を使用すると、IgA または IgM HLA 抗体の検出も可能です。

- B. 一部のレア HLA 抗原は、パネルには含まれていません（A43、B82）。
- C. %PRA の測定は一次スクリーニング的診断検査であり、患者の治療法決定における唯一の根拠ではありません。通常、移植の前に最終的クロスマッチ試験が必要です。

予測値

結果の項を参照してください。

特定の性能特性

- A. 陰性血清では、FL1 ヒストグラム上における蛍光強度のシフトが各血清によって異なる可能性があります。One Lambda 社の Negative Control Serum は、本キットでテストされる陰性血清の全てに比較して、平均蛍光強度がやや高めにシフトする傾向があります。そのため、陽性および陰性カットオフ値の設定には Negative Control Serum を基準にする必要があります。他の陰性血清を陰性コントロールとして用いる場合には、あらかじめ陰性および陽性が判定されているサンプルを用いてカットオフ値を決定する必要があります。
- B. Positive Control Serum のロットが異なる場合にはヒストグラムプロファイルが異なる可能性があります。データシートのコントロールの各ロットの項をご確認ください。
- C. FlowPRA[®] ビーズはロットによってビーズに含まれる HLA 抗原の分布が若干異なるため、ロットによって Positive Control Serum のヒストグラムプロファイルが異なる可能性があります。データシートの FlowPRA[®] ビーズの各ロットの項をご確認ください。

株式会社ベリタス 〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL 03-3593-3211 FAX 03-3593-3216
技術的なお問い合わせは：TEL 03-3593-3385 E-mail techservice@veritastk.co.jp