

組織適合性検査 プロトコール集 (標準方法) (案)

日本移植学会(JST)・暫定案

平成 24 年 9 月 25 日

I.	HLA 抗体検査の説明	5
1.	組織適合性検査の歴史の変遷	5
2.	抗体検査の概略	6
3.	クロスマッチ(リンパ球交差試験)	6
4.	HLA 抗体検査	7
5.	HLA 抗体産生	7
6.	HLA 抗体の特異性	8
II.	検査項目	10
1.	HLA タイピング	10
2.	クロスマッチ	11
(1)	Complement dependent cytotoxicity; CDC 法	11
(2)	Anti-Human Immunoglobulin -CDC; AHG-CDC 法	11
(3)	Flow Cytometry Cross match; FCXM 法	11
(4)	Immunocomplex capture fluorescence analysis; ICFA 法	11
3.	抗体検査	11
(1)	スクリーニング検査(Screening)	11
(2)	抗体同定検査(Single Antigen)	11
III.	標準方法	12
1.	HLA タイピング	12
(1)	PCR-SSO 法(sequence specific oligonucleotide)	13
(2)	PCR-SSP 法(sequence specific primers)	16
(3)	PCR-SBT 法 (sequencing based typing)	18
2.	リンパ球交叉試験(リンパ球クロスマッチ、リンパ球 XM)	22
(1)	直接交叉試験(direct XM)	22
(2)	間接交叉試験(indirect XM)	23
(3)	リンパ球及び T. B 細胞分離	23
(4)	比重遠心法によるリンパ球分離 (2. 3)	26
(5)	T. B 細胞分離	29
(6)	モノクローナル抗体被覆ビーズによるリンパ球サブセット分離(9)..	32
(7)	リンパ球クロスマッチ	36
(8)	Standard 法、Extended incubation 法によるクロスマッチ(1)	40
(9)	Antiglobulin crossmatch (AHG) 法によるクロスマッチ(2)	41
(10)	IM beads XM	43

(11) Flow cytometric crossmatch (FCXM) (4).....	48
(12) IgM 抗体の不活化(1)	57
(13) Pronase treatment of cells for use in FCXM(1)	60
(14) ICFA 法	63
3. HLA 抗体検査.....	68
(1) FlowPRA 法.....	68
(2) Luminex 法	76

参考文献

No. 1 SBT 法

No. 2 ICFA 法

No. 3 FlowPRA (FlowPRA PI)

No. 4 FlowPRA (FLOWPRA SCREENING TEST 添付)

No. 5 FlowPRA (FCM 入門)

No. 6 FlowPRA (FlowPRA ユーサ-のための FCM 機器講座)

No. 7 FlowPRA (FlowPRA サンプル測定のための FCM 設定)

No. 8 FlowPRA (FlowPRA フ-ロトコール Calibur)

No. 9 FlowPRA (FlowPRA FACSCantoII 測定)

No.10 FlowPRA (ASHI4E VI.B.2.1)

はじめに

臓器移植に関連した組織適合性検査(クロスマッチ、HLA タイピング・抗体検査)の必要性は、広く認識され各検査施設で実施されています。近年、検査機器の技術進歩により多くの検査方法が開発され、高感度の測定が可能となりました。その結果、微量の HLA 抗体の検出、その特異性の判定ができるようになり、抗体関連型拒絶反応のリスク診断と移植適応の判定に有用な情報を提供しています。また、HLA 抗体は、急性および慢性拒絶反応、さらには予後との関連も明確になっています。

現在、クロスマッチ陽性などドナー特異的 HLA 抗体陽性移植に対して、脱感作療法を行うことで移植を実施する症例が増加しています。また、抗体関連型拒絶反応の診断、治療効果判定など、移植後においても、組織適合性検査の重要性が高まっています。しかし、移植前の検査方法の選択と結果の解釈、移植適応判定、治療法の選択、移植後のモニタリングの具体的方法については、一定の見解が得られていません。また、検査の実施方法は施設間で異なり、測定結果の乖離(施設間差)につながる可能性も指摘されております。統一した測定方法、判定基準など、検査方法の標準化が望まれています。

このような現状から、移植施設側と検査施設側の情報交換を緊密にし、わが国に適したガイドラインを作成する必要性があり、日本移植学会(JST)と日本組織適合性学会(JSHD)の下部組織として、2010年に HLA 抗体検査に関する共同作業部会を設置して、議論を重ねてまいりました。

本書では、検査施設が求められる検査結果を迅速かつ正確に移植施設に提供できるように、生体および死体臓器移植での移植前および移植後に必要な検査項目とそれらのプロトコールについて記載しました。メンバー全員の合意を得て、最も一般的と考えられる方法を記載してあります。臓器移植に関わる組織適合性検査施設の皆様の参考になれば幸いです。このプロトコール集を公開することで、皆様とともに標準方法を考えて行きたいと思っています。皆様からのご意見をお聞かせ下さいますようお願い申し上げます。

より安全かつ効果的な移植医療を確立するために、各検査方法の標準化を図り、さらに臨床的意義および有用性を検討した上で、組織適合性検査 (HLA 抗体検査) に関するガイドラインを策定していきたくと思っています。

(平成 24 年 9 月 22 日)

日本移植学会、組織適合性学会

HLA抗体検査に関する共同作業部会

小林孝彰（名古屋大学大学院医学系研究科 移植免疫学寄附講座）

（問い合わせ先：takakoba@med.nagoya-u.ac.jp）

臓器移植に関わる組織適合性検査プロトコール集 作成ワーキング

赤座達也（一般財団法人 HLA研究所）

小川公明（公益財団法人骨髄移植推進財団）

黒木聖久（名古屋第二赤十字病院 組織適合検査室）

佐藤 壯（社会医療法人北榆会札幌北榆病院 臨床検査科）

橋口裕樹（福岡赤十字病院 検査部）

橋本光男・木下朋子（兵庫県立西宮病院 腎疾患総合医療センター）

久山芳文（大阪府立急性期・総合医療センター 移植支援検査センター）

丸屋悦子（Terasaki Foundation Laboratory）

安尾美年子（東京女子医科大学 中央検査部移植関連検査室）

I. HLA 抗体検査の説明

1. 組織適合性検査の歴史的変遷

1950 年代

- ドセー(J.Dausset)により白血球の凝集反応から HLA 抗原が発見される。
- ファンロード (J.J.van Rood) やペイン(R.Payne)により、妊娠で、夫 HLA 抗原による感作で HLA 抗体が産生される事が確認される。

1960 年代

- テラサキ(P.I.Terasaki)により、タイピングに Lymphocyte Cytotoxicity Test (LCT 法)が考案される。
- LCT 法を用いたリンパ球交差試験(ダイレクトクロスマッチ)が開始される。

1970 年代

- リンパ球を T リンパ球と B リンパ球に分離・精製した、リンパ球交差試験が開始される。

1980 年代

- 血清を Dithiothreitol (DTT) 処理することにより IgM の影響を排除したリンパ球交差試験が開始される。
- 測定系に Flowcytometry (FCM) を用い高感度化されたリンパ球交差試験 : Flow Cytometry Cross Match (FCXM)が開始される。
- 凍結パネルセルを用いた Panel Reactive Antibody (PRA)および特異性を把握するための LCT 法による HLA 抗体キットが実用化される。
- HLA タイピングの DNA タイピング化が開始される。

1990 年代

- HLA 抗体キットは、LCT 法から高感度な Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) さらに高感度な FCM や蛍光ビーズ測定装置 (Luminex) での測定へと推移していった。

2000 年代

- HLA タイピングは、全 Locus が DNA タイピングで実施されるようになった。
- HLA 抗体検査では一種類の HLA 分子だけを固層したビーズキットが実用化され特異性を極めてシャープに判定する事が出来るようになった。

2. 抗体検査の概略

この抗体検査の結果によって、移植を実施するか、断念するを決定する場合があるので、慎重を要する検査である。また、臓器提供を受けた患者には、少しでも長期に、機能維持される事を期待し、この検査を実施するものである。

移植前の抗体検査は、標的にドナーリンパ球を使用するクロスマッチ（リンパ球交差試験）と、標的に HLA 分子をコーティングした、マイクロビーズ(疑似リンパ球)を使用する HLA 抗体検査の二つに大別され、後者は、移植後の拒絶兆候把握のモニタリングにも活用されている。

抗体検査で最も重要な事は、超急性を含む拒絶反応を惹起するドナーHLA 抗原に反応する HLA 抗体=Donor Specific Antibodies (DSA) の存在を把握することである。HLA 抗体検査では、ドナーHLA 抗原以外の HLA 抗原に反応する HLA 抗体=Non DSA (NDSA)も検出される。NDSA が、直接的に拒絶に関わることは無いと思われる。移植後は、ドナーHLA 抗原による感作が継続するため DSA が産生される可能性が高くなる、産生された DSA は、初期は移植臓器に吸収されるので NDSA が先に検出される傾向があり、長期の観察が必要と推察される。HLA 抗体以外の抗体=Non HLA (NHLA)とされる抗体の中では、MICA 抗体の臨床的影響が報告されている^{1、2)}。MICA 抗原はリンパ球には発現していないためクロスマッチでは検出されない。一部の HLA 抗体検査キット(LABScreen Mixed Class I & II、LABScreen MICA Single Antigen)においては、MICA 抗体も検出出来るように構成されている。

3. クロスマッチ(リンパ球交差試験)

標的にドナーリンパ球を用いる LCT 法や anti-human-globulin-LCT (AHG-LCT) 法は、補体依存性抗体による細胞傷害性を検出するので、Complement Dependent Cytotoxicity (CDC 法)とも呼ばれる。Viability の十分なドナーリンパ球が得られないことで陽性・陰性の判定に苦慮することもあるが、LCT 法は長い歴史を持ち、T 細胞クロスマッチが陽性の場合、腎移植では移植禁忌とされていた。FCXM は前者より非常に高感度であり、非補体依存性抗体も検出可能である。ただし、LCT 法ほどの歴史は無く、十分な症例数の検討がなされていないため、移植禁忌のカットオフレベルは、未だ標準化されていない。クロスマッチの特徴は、DSA の検出が可能なことであるが、商品化されたキットは存在せず、各ラボが独自に試薬を集め運用しているのが現状である。

なお、HLA 抗体検査を併用することにより、クロスマッチ陽性・陰性判断を裏打ちする事が可能である。

4. HLA 抗体検査

標的に HLA 分子をコーティングした、マイクロビーズ(疑似リンパ球)を用いるキットが利用可能である。FCM や、蛍光ビーズ測定装置 (Luminex) を使用し、FCXM と同様に高い感度を有する。HLA 抗体存在の有無の判定と HLA 抗体の特異性を決定する 2 種類のキットが存在する。DSA や、NDSA を高感度に検出することが可能である。ドナーリンパ球を必要とせず、低濃度 (少量) HLA 抗体をも把握できるため、拒絶モニタリングへの活用が期待されている。クロスマッチと HLA 抗体検査は互いに補完しあう関係であり、DSA を検出するための車の両輪である。互いの特性を表 1 に示す。

表 1) 抗体検査の特性

	検査方法	対象とする特異性		
		DSA	NDSA	NHLA (MICA)
クロスマッチ	CDC	○	×	×
	AHG-CDC			
	FCXM	○	×	×
HLA 抗体検査	FCM 蛍光ビーズ測定装置	○	○	○*1)

検出可能⇒○ 検出不可能⇒×

*1): 現行のキットで MICA 検出に対応しているのは LABScreen Mixed Class I & II、LABScreen MICA Single Antigen である。

5. HLA 抗体産生

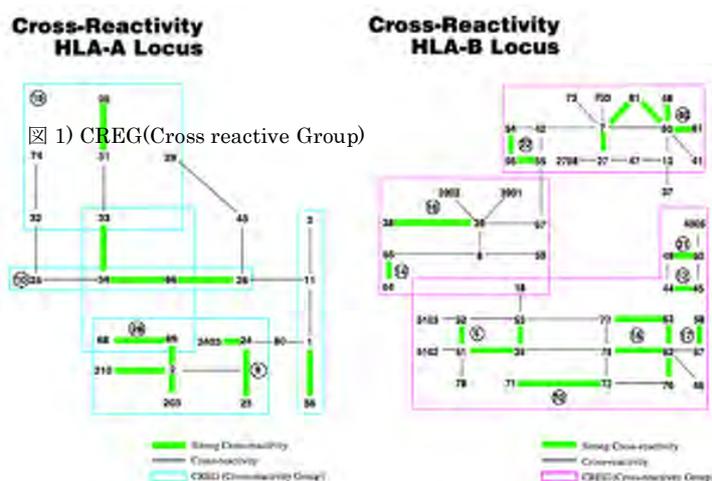
一般に、HLA 抗体の産生は、非自己 HLA による感作によるが、感作の機会 は、妊娠・輸血・移植にほぼ限られている。

自己が保有する HLA 抗原に対する抗体は産生されない。例外的として、全く感作歴の無い患者においても HLA 抗体が検出される事がある。これは、食物由来のペプチドや、予防接種等により、産生された抗体が、HLA 抗体検査

が高感度になったため、HLA 抗原に対する交差反応で HLA 自然抗体として検出されたものと考えられる。例えば、日本人に存在しない HLA-A80 や B8 等に反応する HLA 抗体が検出された場合などは、HLA 自然抗体と推定される。しかしながら、日本人に存在する HLA 抗原に対する HLA 自然抗体も知られている³⁾。HLA 抗体検査を実施するうえで、患者の感作歴や、患者・ドナーの HLA 抗原は、重要な情報であり、HLA 抗体検査の精度・判定に直結する要因である。検査施設がこのような情報を把握したうえで検査を実施出来る環境作りには、臨床側の協力が不可欠と考える。

6. HLA 抗体の特異性

ひとつの HLA 抗原にのみ特異的な HLA 抗体も存在するが、検査の高感度化により、複数の HLA 抗原に幅広く反応する特異性を有する HLA 抗体が多く存在する事がわかってきた。かつて HLA タイピングは、妊娠により感作され産生された HLA 抗体を用いて LCT 法で実施されており、HLA タイピングに使用できる HLA 抗体を見出すために、膨大な数の妊婦出産血からの HLA 抗体スクリーニングが実施されていた。その当時から、交差反応性を呈する幅広い HLA 特異性を持つ抗体を調べていくと、その反応が、幾つかのグループに分けられる事が知られていた。現在、HLA 抗体検査から得られる結果も同様であり、これを Cross reactive Group (CREG) と呼ぶ。(図 1)



各 HLA 抗原は、複数のエピトープ(抗原決定基)を持っており、多くのエピトープは複数の HLA 抗原間で共有される事がある。CREG とエピトープの関係についての具体例を表 2 に示す。

表 2) CREG とエピトープ

	HLA 分子でのアミノ酸の位置					アミノ酸	エピトープを有する HLA アリル					
	138	142	144	145	149		A*02 : 01	A*02 : 03	A*02 : 06	A*68 : 01	A*68 : 02	A*69 : 01
A2 グループ	138	142	144	145	149	MTKHA	A*02 : 01	A*02 : 03	A*02 : 06	A*68 : 01	A*68 : 02	A*69 : 01
B40 グループ	177	178				DK	B*07 : 02	B*40 : 01	B*48 : 01	B*81 : 01		

CREG の概念は、HLA 抗体の特異性を解析・理解するうえで、重要な情報である。しかし、複数の HLA 抗体が同時に含まれる場合もあるので、注意が必要である。

文献

- 1) Zou Y, et al : Antibodies against MICA antigens and Kidney-transplant rejection , N Engl J Med 352 : 558-569, 2005
- 2) P. Terasaki, et al : Four-year Follow-up of a Prospective Trial of HLA and MICA Antibodies on Kidney Graft Survival, American Journal of Transplantation(7):408-415, 2007
- 3) 佐治 博夫 : 「シリーズ : 各臓器移植についての拒絶反応の解説・移植の新しい治療法の紹介」 第 4 回 移植における液性免疫制御の重要性と HLA 血清学—直接クロスマッチから HLA タイプ&スクリーニングへ—、MHC(18) : 31-46、2011

(小川 公明)

II. 検査項目

1. HLA タイピング

移植においてHLA抗原の免疫学関与は大きく、ドナーとレシピエントのHLAのミスマッチが少ないほど、生着率は良好な成績である。またドナーのHLAはDSA(Donor Specific Antibody)を推測するうえで、ドナーHLA型は極めて重要な情報となる。

【項目】

以下の4項目を必須とする。測定法はDNAを用いたタイピング法であること。

- HLA-A
- HLA-B
- HLA-DRB1
- HLA-DRB3/4/5

検査可能であれば次の項目もDNAを用いたタイピングを行う事が望ましい。

- HLA-C
- HLA-DQ
- HLA-DP

【結果】

第1区域(関連する血清学的HLA型あるいはアレルグループによりアレルを判別する領域)が区別できること。第1区域においてアンビギュイティ(ambiguity)で判別出来ない結果の場合は、他の試薬キットまたはタイピング法により第1区域について判別すること。中または高解像度レベル(high resolution)のタイピング法が可能であれば、行う事が望ましい。

【表記】

HLA標準化委員会の“HLAタイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則”に従い表記を行い報告する。また各解像度レベルに沿った表記をおこなうこと。

2. クロスマッチ

【項目】

- (1) Complement dependent cytotoxicity; CDC 法
=Lymphocyte cytotoxicity test; LCT 法
- (2) Anti-Human Immunoglobulin -CDC; AHG-CDC 法
- (3) Flow Cytometry Cross match; FCXM 法
- (4) Immunocomplex capture fluorescence analysis; ICFA 法

3. 抗体検査

【項目】

(1) スクリーニング検査(Screening)

クラス I、クラス II の HLA 抗体を幅広く、有無を同定する方法であること。

(2) 抗体同定検査(Single Antigen)

スクリーニングで検出された抗体が DSA(Donor Specific Antibodies)であるか判別できる方法であること。いずれの検査も高感度であるフローサイトメトリーや、Luminex を用いた方法が望ましい。また使用する試薬キットの抗原(抗原 Beads)の特徴を把握し選択すべきである。

III. 標準方法

1. HLA タイピング

HLA 抗原型は以前 HLA 抗血清を用いた血清学的方法により同定されていたが、現在では DNA タイピングキットが各種市販されており、HLA 抗原の遺伝子型（アレル型）として検出され、これを抗原型に置き換えるのが一般的になった。

血清学では生きているリンパ球と必要な HLA 特異抗血清が揃わなければ HLA 抗原型は同定できなかったが、DNA タイピングを用いることにより HLA は遺伝子型として判定され、ほぼ確実にタイピングできるようになった。

市販されているタイピングキットのうち、現在一般的に使用されているキットの主なものについて、原理と特徴を挙げたが、実際の操作手順の詳細は各キットのマニュアルに従っていただきたい。

【検体】

サンプル DNA は、通常は末梢血を溶血して得た白血球などから下記の方法などにより抽出する。

A. Proteinase K 法

末梢血 1~2ml を溶血させてペレットにした白血球に Tris・NaCl・EDTA 溶液を 0.5ml、プロテイナーゼ K 液 (10mg/ml) 0.5ml を加えよくほぐす。さらに 10%SDS を 0.25ml 37°C 2時間以上、トリス・フェノールを等量加えて混和、1000rpm 5分遠心後上層（水層）を回収する。

* 以前は従来法として一般的であったが、手間と時間がかかり通常の HLA-DNA タイピングにはあまり用いられなくなった。

B. グアニジン法

末梢血 1~3ml を生食などで 2~3 度洗浄して血小板をなるべく減らし、上清を捨てて溶血バッファーで溶血させる。遠心して沈んだ白血球を 1 度洗浄して上清を捨て、これにグアニジン溶液を 2~3ml 加え、ボルテックスで良く攪拌する。新鮮血なら 30 秒~1 分ほどで白血球は完全に溶ける。これに 2 倍量の特級エタノールを加えて転倒混和すると糸くず状の DNA が現れる。

*溶血が早ければ 15～30 分で DNA が抽出でき、安価である。

*白血球の量に対してグアニジン溶液が足りないと攪拌しても溶けきれず、エタノール沈殿の際 DNA にゼリー状の蛋白が付着した状態になり、DNA の純度が悪くなる。

グアニジン溶液：グアニジンチオシアン酸塩（100g）・N-Lauroylsarcosine Sodium salt Solution（3.5ml）・1M クエン酸 Na（4.88ml）蒸留水で全量を 211.58ml

C. スピンカラム法

QIAamp DNA Blood Mini(QIAGEN 社)

JetQuick Blood DNA Spin Kit(VERITAS)など

DNA の純度について

抽出した DNA の純度はタイピングキットによっては大きく影響する。DNA の吸光極大値は 260nm、タンパク質の吸光 280nm との比 A260/A280 が 1.8～2.0 以内であれば純度は良いと判断する。これより低い場合はタンパク質などの混入が考えられる。

(1) PCR-SSO 法(sequence specific oligonucleotide)

【原理】

PCR-SSO 法は HLA クラスごとに generic primer を用いて、PCR 法により HLA の各アレルに特徴的な塩基配列を増幅し、その PCR 産物に対して特異的なプローブとの反応を検出することによりその特異性(HLA 遺伝子型)を判定するタイピング法である。通常は多数のプローブをストリップ・ウエル・ビーズなどに固定したものと、増幅した PCR 産物を 1 本鎖に変性したものとを反応させて発色させる(reverse SSO)。PCR-SSP 法に比べて、DNA 量がかなり少なくても検査が可能である。Middle～High resolution の検査が可能である。

D. reverse SSO : 蛍光ビーズ法

a. LABType. WAKFlow. GenoSearch

【特徴】

濃度を調整した DNA サンプルと HLA のローカス別プライマーMix および増幅試薬・DNA ポリメラーゼを PCR チューブに分注して、指定された条件で PCR を行う。増幅したサンプル DNA を 1 本鎖にして中和し、各種プローブが固定されたビーズミックスと混和したのち、指定された温度・時間でインキュベーション(ハイブリダイゼーション)・蛍光標識し、洗浄して Luminex システムで測定する。結果は専用の判定ソフトウェアで判定する。

【機器】

- サーマルサイクラー(DNA 増幅器)
- Luminex (100/200 システム・LABScan100 など)
- ボルテックスミキサー
- 遠心機

【結果、解析】

プローブにより蛍光値が異なるが、どのプローブを陽性とするかはプログラムに組み込まれているため、自動的に判定される。メーカー指定のカットオフ値はあるが絶対的なものではないので、カットオフ値を変更してアサインするときは注意が必要である。

【注意点】

ハイブリダイゼーションの温度(キットにより 52℃・55℃・60℃など)を正確に設定する。ビーズの洗浄が不十分であると、バックグラウンドが高くなるので、ボルテックスミキサーなどで良く攪拌してから洗浄する。

【参考 URL】

LABType SSO <http://www.veritastk.co.jp/>

WAK Flow HLA <http://www.wakunagahla.jp/products/wakflow/theory.html>

ジェノサーチ HLA <http://www.mbl.co.jp/diagnostic/products/hla.html>

b. INNO-LiPA

【特徴】

DNA の HLA 領域を、ビオチン化したプライマーを用いて PCR 法で増幅させ、プローブを固定したストリップと PCR 産物をハイブリダイゼーションさせて、発色したバンドの組み合わせパターンから HLA アリルを判定する。

【機器】

- ウォーターバス(振盪できるもの)
- サーマルサイクラー
- ボルテックスミキサー
- マイクロ遠心機

【結果、解析】

専用ソフトで判定する。日本人に多い 4 桁レベルのアリルの **ambiguity** がやや多いので、アサインされた第一候補の 4 桁アリルが納得できない場合は他法と併用する。

【注意点】

ウォーターバスを使用するハイブリダイゼーションのとき、トレイに水が入らないよう工夫するとともに、トレイ中のバッファの温度を正確に保つ。

【参考 URL】

INNO-LiPA: <http://www.veritastk.co.jp/>

(2) PCR-SSP 法(sequence specific primers)

【原理】

DNA の HLA 領域において、各アレルの塩基配列特異的なプライマーがセットされているプレートを用いて PCR を行う。PCR 後、増幅された DNA をゲル電気泳動法により DNA バンドとして検出する。HLA アレルグループは、増幅が起きたウェルに使用されたプライマーの特異性を示したワークシート、または専用の解析ソフトウェアにより判定する。

【特徴】

PCR の時間も比較的短く、電気泳動時間と合わせても 2 時間程度で判定できる。基本的に low resolution の検査を目的として作製されたため、4 桁のアサインメントには ambiguity が多すぎる。サンプルの DNA 量が少ないときには不向きである。Class I、II を同時にタイピングする場合は 96 ウェルで 1 検体であるため、1 度に多くの検体を検査することはできないが、他検体のローカスと取り違える危険性はない。

【検体】

サンプル DNA 濃度は 50~100ng/μL(OD260/OD280 は 1.65~1.80)

【機器】

- サーマルサイクラー(96 ウェル)
- 各キット専用の電気泳動装置
- 電子レンジ(アガロースゲルの溶解)
- パワーサプライ(定電圧 150V 設定可能なもの)
- UV トランスイルミネーター
- ボルテックスミキサー
- マイクロ遠心機

【結果、解析】

専用の解析ソフトウェアを使用する。ワークシートを使用する場合は日本人に多いアレルを選んで作製しておくとう便利であるが、ambiguity が多いため、解析ソフトで確認するべきである。

【注意点】

電気泳動用ゲルの作成および電気泳動に問題がある場合が多いので、各キットのマニュアルに従う。

【参考 URL】

マイクロ SSP-HLA-DNA タイピングキット マニュアル

www.veritastk.co.jp/attached/2952/MicroSSP_Manual_JPN.pdf

(3) PCR-SBT 法 (sequencing based typing)

【原理】

HLA の遺伝子領域の PCR 産物より、シーケンスプライマーを用いてシーケンス反応を行い、シーケンサーで泳動して塩基配列を決定する。これを、すでに判っている HLA アリルの塩基配列と照合して HLA アリルを判定する。

【特徴】

少量の DNA サンプルで検査が可能である。4 桁～6 桁の high resolution であるが、ambiguity があるので注意が必要である。現在は多くの施設で他のタイピング法と併用している。検査費用は高価であるが、新しいアリルが検出できる。

【機器】

- サーマルサイクラー
- シーケンサー

【検査】 Abbott Allele SEQR SBT

- 1) PCR 増幅反応を行う直前に、新しく PCR Premix と AmpliTaq Gold を Tube に調整する。

HLA-A. -B. -C			HLA--DRB1. -DPB1. DQB1		
反応数	PCR Premix	AmpliTaq Gold	反応数	PCR Premix	AmpliTaq Gold
1	16 μ L	0.3 μ L	1	8 μ L	0.1 μ L
5	80 μ L	1.5 μ L	10	80 μ L	1.0 μ L
10	160 μ L	3.0 μ L	25	200 μ L	2.5 μ L
25	400 μ L	7.5 μ L	100	800 μ L	10 μ L

- 2) 適切な PCR/Taq Mix 量を PCR チューブ又は Wellplate に分注する。

- HLA-A. -B. -C 16 μ L
- HLA-DRB1. -DPB1. DQB1 8 μ L

- 3) DNA(20 ng/ μ L)又は滅菌蒸留水(陰性コントロールチューブ)を加える。

- HLA-A. -B. -C 4 μ L

- HLA-DRB1. -DPB1. DQB1 2 μ L
- 4) 軽く遠心する(5Sec)
- 5) PCR 増幅条件を設定し PCR を行う。

「PCR 産物の精製」

- 1) PCR Clean-up 処理により余分な PCR プライマー及び dNTP を除去。
- HLA-A. -B. -C PCR 産物そのまま使用
- HLA-DRB1.-DPB1. DQB1 TE-4 又は滅菌蒸留水で 2:1 に希釈 (10 μ L PCR 産物に 20 μ L 希釈液を加える)
- 2) 各チューブに 3 μ L ExoSAP-IT を加えて、軽く攪拌し遠心する。
- 3) PCR 装置にて加熱する。

サイクル数	温度	時間
1	37°C	15 分
1	80°C	15 分
1	4°C	—

「シーケンシング反応」

- 1) ローカスに必要なシーケンシング反応チューブを準備する

Class I HLA			Class II HLA		
A	B	C	DRB1	DPB1	DQB1
Exon 2F	Exon 2F	Exon 2F	Exon 2F	Exon 2F	Exon 2F
Exon 2R	Exon 2R	Exon 2R	Exon 2R	Exon 2R	Exon 2R
Exon 3F	Exon 3F	Exon 3F	Codon 86	Codon 85	Exon 3F
Exon 3R	Exon 3R	Exon 3R			Exon 4F
Exon 4F	Exon 4F	Exon 4F			
Exon 4R	Exon 4R	Exon 4R			

- 2) 各チューブに 8 μ L シーケンシング試薬を分注する
- 3) 2 μ L ExoSAP-IT 処理済みの PCR 産物を添加し、軽く遠心する

4) PCR 装置にてシーケンシング反応を行う

サイクル数	温度	時間
25	96°C	20 秒
	50°C	30 秒
	60°C	2 分
1	4°C	—

「エタノール沈殿によるシーケンシング反応産物の精製」

- 1) シーケンシング反応チューブに 2 μ L NAOAc/EDTA を分注し 500 \times g、30 秒で遠心する。
- 2) 25 μ L 100% エタノールを加え、15 秒ぐらい激しく攪拌する
(要注意：必ず激しい攪拌を行うこと！！)
- 3) 2000 \times g、30 分で遠心する。
- 4) 96 ウェルトレーを逆さまにしペーパータオルに軽く叩き上清を除去して、遠心する(50-100 \times g 10 秒)
- 5) 50 μ L の 80% エタノールを加え、遠心する(2000 \times g、5 分)。
- 6) 再び PCR トレーを逆さまにし、ペーパータオルに軽く叩き上清を除去してから遠心する(50-100 \times g、10 秒)。

「電気泳動」

- 1) 精製したシーケンシング反応産物に 1.5 μ L HiDi ホルムアミドを加え、軽く遠心してからサマーマルサイクラーにて 95°C、2 分間加熱変性。
- 2) 2~3 分間冷やし DNA シーケンサで泳動する。

【結果、解析】

- HLA-A. B. C. DRB1. DQB1. DPB1 すべてを自動解析複数検体、複数ローカスの解析が一度に行える
- 簡便な操作で塩基配列の確認・編集 AlleleSEQR HARPs の利用で Ambiguity を大幅に解消

【注意点】

- HLA のアリル数は年々増加しているため、解析ソフトが頻繁に更新されるので、判定する際は最新のをダウンロードする必要がある。
- HLA タイピングの結果について
まず、日本人のようであれば日本人の HLA アリルの頻度を確認する。稀なタイプまたは日本人に無いタイプであれば、再検するか、他の方法で確認する。
- 連鎖不平衡が高いハプロタイプのものであるが、1 アリルが違うときは再検する。
- 生体腎移植の場合、実の親子であれば1 ハプロタイプが一致する。(稀にクロスオーバーもある。)
- どのキットを使用しても4 桁以上ではたいてい **Ambiguity** があるので、別の方法で検査した場合、1 番目に選ばれるアリルの4 桁は異なる場合がある。
- 検査施設により、求められる結果の表記が違うので、抗原型に書き換える場合、4 桁アリルの場合など正しく表記する。

参考資料 No.1 SBT 法 参照

2. リンパ球交叉試験(リンパ球クロスマッチ、リンパ球 XM)

【目的】

- 細胞障害或いは Flow cytometry で検出するリンパ球クロスマッチ(cell-based XM) は、移植後早期の抗体関連型拒絶反応(AMR)を発症する危険因子であるドナー特異的 HLA 抗体(DSA)を検出するために行う。
- リンパ球クロスマッチは 1960 年代に腎移植の超急性拒絶反応のリスクのあるレシピエントとドナーの組み合わせを推定する手段として導入され、クロスマッチ陽性は移植禁忌とされてきた⁽¹⁾。
- 近年、新しい免疫抑制剤の開発と抗体検出感度の高い HLA 固相化法が導入され、検出された抗体のレベルと特異性を評価することが可能となり、移植適応、免疫抑制剤の選択に有効な情報を提供することができるようになった。
- しかし、現在実施されているクロスマッチは、一つの方法だけではグラフト生着に与える影響を評価することはできないので、異なる幾つかのクロスマッチ法で評価することが重要である⁽²⁾。
- 特に、cell-based XM は DSA だけではなく自己抗体や Lewis 等 non-HLA 抗体も検出するので、Flow PRA 等の既存抗体検査とセットで行うことが重要である。
- MICA、MICB、Vimentin、Angiotensin Type 1 Receptor(AT₁R)等の non-HLA 抗体は、リンパ球クロスマッチでは検出できないので言及しない。

【方法概略】

Gebel 等は、XM を以下の 2 つに分類している²⁾。

(1) 直接交叉試験(direct XM)

A. 標準法 (Basic XM、Standard XM、NIH XM、No-wash XM)⁽³⁾

B. Extended CDC T cell XM

- 血清反応と補体反応の反応時間を長くして検出感度を上げる。

C. Amos (3 wash)、Amos-modified (1 wash) CDC T cell XM

- 血清反応後に洗浄操作を加えて偽陰性の原因となる抗補体因子と未結合の血清成分を除去する⁽⁴⁾。

(2) 間接交叉試験(indirect XM)

D. AHG T cell XM

- 抗ヒトグロブリン抗体(AHG)を加えて、低力価抗体と補体非結合性抗体を検出する(5)。

E. AHG B cell XM

- B cell は sIg を発現しているので AHG と結合するが、2 色蛍光法により最初に蛍光標識抗ヒト IgG 抗体を B cell の sIg と結合させる(6)。

F. Flow cytometry XM (FCXM)

- CDC 法と比較して、AHG-CDC 法よりも $10^1 \sim 10^3$ 倍感度が高く、T、B cell の分離を行わずに同時測定が可能で、半定量的に測定できる(7)。

【参考文献】

- 1) R. Patel. New Eng J Med 1969 ; 280 : 735
- 2) HM. Gebel. Am J Transplant 2003 ; 3 : 1488
- 3) PI. Terasaki. Naid manual of tissue typing techniques .p 69. 1976- 1977
- 4) DB. Amos. Transplantation 1970 ; 7 : 220
- 5) AH. Johnson. Tissue Antigens 1972 ; 56 : 94
- 6) HM. Gebel. Tissue Antigens 1984 ; 23 : 135
- 7) MR. Garovoy. Transplant Proc 1983 ; 15 : 1939

(3) リンパ球及び T、B 細胞分離

【概略】

標的細胞のドナーリンパ球は以下の条件を満たしていなければならない。

- viability : $\geq 80\%$
- 純度 : 顆粒球、赤血球、血小板等の非リンパ球が混入していない。
- 回収率 : T、 B 細胞分離に必要な充分量のリンパ球が必要で、採血量は回収率に影響する要因を考慮する必要がある。

(表 3) リンパ球分離に影響する要因

要因	影響
年齢	年齢と共にリンパ球数は減少
人工呼吸器装着	多形核球(polymorphonuclears. PMNs)が増加、分離が困難
ステロイド	リンパ球の HLA 発現量が減少、viability 不良
温度 <2℃ or >40℃	末梢血からリンパ球分離が困難
時間	時間経過と共に viability 不良
輸血	判定結果の解釈
採血針	viable リンパ球が減少
真空採血管	細胞障害

(表 4) ヒト組織のリンパ球分布(個人差、時間内変動がみられる)

組織	T cells (%)	B cells (%)
末梢血	50-90	5-20
リンパ節	75	25
胸腺	80	15
脾臓	50	50

【適応試料】

- XM に使用する血清とリンパ球は末梢静脈血由来とする。
- 血清用の末梢血：10ml(分離剤入りの凝固用チューブ)採血する。
- リンパ球分離用の末梢血：50ml (抗凝固剤入りチューブ) 採血する。
- heparin Na は細胞保存に適さないので緊急時以外は使用しない。
- 白血球数が異常値のドナーは採血量を指示する。
- 採血用チューブは各施設の方法に従ってラベリングする。
- 採血した血液は室温で保存し、できるだけ速やかに検査ラボに搬送する(採血後 24 時間内に搬送するのがよい)。

【適応外試料】

- 採血後 24 時間を経過した血液は、細胞状態が不良となる可能性が高くなるので望ましくない(80%以上の生細胞率でなければならない)。

- 凍結融解した血液
- 適応試料以外の方法で採血した試料
- 抗凝固剤入りチューブで採血した凝固血
- 未ラベリング試料
- 溶血の激しい試料

【解決策】

適応外試料を受け取った場合は QA(Quality Assurance)に従って状況を文書化して、管理責任者に通知し、再採血の依頼を行う。

G. 凝固剤

抗凝固剤	特徴
Heparin Na	cell-based assay に最適な抗凝固剤
	細胞の viability を 48-72hrs まで維持
	25-50 units / ml 血液
	PCR による DNA 増幅を阻害する
Acid citrate dextrose (ACD-A, ACD-B)	最も多くのタイピングセンターで使用
Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)	キレート剤は血液中の Ca ²⁺ 等の 2 価陽イオンと結合して、補体活性化を阻害
Sodium citrate	

H. 採血と血液の保存・搬送

- 採血量は検査項目とリンパ球数(白血球 x %リンパ球)、XM のレシピエント候補者数に依存する。
- 採血量は 50ml とする。
- 抗凝固剤加血は、無菌状態、常温で保存・搬送しなければならない。
- 無菌血液は、リンパ球の 24 時間以上の viability を維持させ、冷蔵、或いは高温での保存はリンパ球を分離する時の純度に影響する。

(4) 比重遠心法によるリンパ球分離 (2.3)

【目的】

- 末梢血はリンパ球、単球、顆粒球、赤血球および血小板を含んでいるので、これらの細胞の物理化学的特性であるサイズ、密度、接着性、貪食能、細胞表面マーカーの発現等を利用して、それぞれの細胞を分離することができる。
- 分離する方法は簡素で、短時間処理が原則であるが、分離細胞の純度細胞状態(viability)を最優先に選択しなければならない。
- 最も一般的に使用されている方法は **Ficoll-Hypaque** 液を用いた比重遠法である。**Ficoll** は高分子ショ糖重合体で、赤血球の凝集反応を促進させ、**Hypaque** はヨウ素化有機物の比重液で、 $d=1.077$ に調製されている。リンパ球と一部の単球は比重液の上層、赤血球と顆粒球は比重液の下に沈殿する。

【試料】

- 抗凝固剤加末梢血
 - ◆ Heparin Na 加血は、採血後 12 時間以内に分離すること
 - ◆ ACD (acid citrate dextrose) 或いは CPDA (citrate phosphate dextrose adenine)加血は、採血後 3 日以内に分離すること
- リンパ節
- 脾臓

【試薬】

- **Ficoll-Hypaque 液($d=1.077$)**
自家製で調製できるが、市販品が幾つかのメーカーから販売されている。
- **Hank's balanced solution(HBSS) pH=7.4-7.6**
- **RPMI1640(pH=7.2) 又は McCoy's 5a 液(pH=7.2)**
- **牛胎児血清(Fetal bovine serum、FBS)**
- **Thrombin(100units/ml)**
- **溶血試薬(0.01M Tris - 0.83% NH_4Cl)**

【機器・備品】

- 遠心機
- (免疫血清学用遠心機 (Fisher 遠心機))
- 卓上型振盪恒温槽
- 恒温器 (ふ卵器)
- 顕微鏡

【準備】

- 溶血試薬(0.01 M Tris - 0.83% NH₄Cl)作製

Tris (2-Amino-2-hydroxymethyle-1.3-prpanediol) 1.2 g

NH₄Cl 8.3 g

蒸留水で 1.000 ml に溶かす(1N HCl で pH 7.2-7.4 に調整)

Autoclave

- RPMI 1640-5% FBS 又は McCoy's 5a-5% FBS 作製
FBS を 56°C、30 分間不活化して、その 25 ml を 500 ml 培養液(RPMI 1640 又は McCoy's 5a)に 0.22 μ m フィルターでろ過滅菌しながら加える。
- Ficoll-Hypaque 液、洗浄液、溶血試薬を室温に戻す。
- 振盪恒温槽又は恒温器を 37°C にセットする。

【方法】

- 1) 抗凝固剤加血を 15ml 遠心チューブに移し、スウィング型遠心機で、2.000 rpm、室温、10 分間遠心する。
- 2) 上清を捨て、血漿と赤血球層の中間の白い buffy coat を約 2 ml を新しい遠心チューブに採取し、等量の HBSS を加えてよく混和する。
- 3) 別の遠心チューブに Ficoll-Hypaque 液^{*1)}(d=1.077)を加え、この上によく混和した buffy coat 液を静かにチューブ壁に沿わせて重層する。
- 4) スウィング型遠心機で、2.000 rpm、室温、20 分間遠心する。
- 5) 遠心後、リンパ球と単球の単核球は、上清の HBSS と比重液の間に白い層(リング)になって浮遊している。
- 6) このリングを採取して新しい遠心チューブに移し^{*2)}、HBSS で希釈して再浮遊させる。
- 7) スウィング型遠心機で、1.500 rpm、室温、5 分間遠心する。

- 8) 上清を捨て、1 ml の HBSS に再浮遊させて、Fisher tube に移す。
- 9) Fisher 遠心機で、1.000 g、室温、1 分間遠心する。
- 10) 9)の操作を 2 回繰り返して、上清が透明になるまで繰り返す*3) *4)。
- 11) 上清を捨て、1 ml の RPMI 1640-5% FCS を加え、混和後 Thrombin (100 units / ml) を 1 滴加えて、2 分間、転倒混和する。
- 12) Fisher 遠心機で、1.000 g、室温、3 秒間遠心する。
- 13) リンパ球が含まれている上清を新しい Fisher tube に移して、Fisher 遠心機で、1.000 g、室温、1 分間遠心する。
- 14) 12)の Fisher tube の沈殿物は単球とリンパ球が含まれているので、リンパ球を再回収するために、11)- 12) のステップを繰り返して、上清は (13)の Fisher tube に移して Fisher 遠心機で、1.000 g、室温、1 分間遠心する。
- 15) 上清を捨て、500 μ l の RPMI 1640-5% FCS を加えて、その一部の 50 μ l のリンパ球浮遊液の細胞数を $3 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整してクロスマッチの全リンパ球浮遊液とし、残りの 450 μ l のリンパ球浮遊液から T. B 細胞に分離する。

【注意点】

- *1) Ficoll-Hypaque 液は常温に戻してから buffy coat を重層しないと、リンパ球の回収率が低下する。
- *2) リンパ球層はパスツールピペットで、できるだけ比重液を採らないように採取する。
- *3) 血小板を除去しなければ、CDC-XM の偽陰性反応の原因になる。
- *4) 赤血球が混入している場合は溶血試薬を加えて、振盪恒温槽で、37°C、10 分間インキュベートして溶血させる。

【問題点と解決策】

問題点	原因	解決策
(1) リンパ球層がない	高脂血	空腹時血液を使用
	遠心力弱い或いは時間が短い	2.000 rpm. 20 分
(2) リンパ球の回収率低い	白血球が少ない	採血量を増やす
	Buffy coat が赤血球層に残っている	Buffy coat 層を多めに採取
	細胞塊	培養液に再浮遊させて攪拌
(3) 単核球が洗浄後沈殿しない	洗浄液量が少ない (過剰の Ficoll 層採取)	洗浄液量を増やす
(4) viability 不良	血液を 24 時間以上放置	再採血
	洗浄液に蛋白質添加していない	洗浄液+5% FBS
(5) 顆粒球の混入	顆粒球の比重変化	細胞沈殿物を 40% Percoll 1ml に浮遊させて、2.000g、1 分遠心
	比重液の比重が高い	d=1.077 に調整
(6) 血小板の混入	血液を 24 時間以上放置	再採血
	Heparin 採血	Thrombin 処理

(5) T, B 細胞分離

I. ナイロンウールカラム (4, 5)

【目的】

- CDC-T、CDC-B XM の標的細胞となる。
- 特に CDC-B XM は、B 細胞の HLA 抗原発現量は T 細胞よりも多く、より低濃度の HLA 抗体で補体活性化が進み細胞溶解を引き起こすことから、CDC-T XM よりも抗体検出感度が高い⁶⁾。但し、CDC-T(-) / CDC-B(+)⁷⁾症例の 75%以上は HLA 抗体以外の非特異的反応であることを注意する必要がある⁷⁾。

- ナイロンウールカラム法は、B 細胞はナイロンウールに付着し、T 細胞は付着しない物理的性質を利用した短時間且つ簡素な分離方法であるが、20℃以下の低温度或いはアジ化 Na、EDTA 存在下では付着率は減少する。

【試料】

>80% viability のリンパ球

【試薬・消耗品】

- RPMI 1640-5% FBS 又は McCoy's 5a 液-5% FBS (pH=7.2)
- Deoxyribonuclease (DNAse) : 2.75 mg/ml stock solution
-80℃で分注して保存
- Bovine serum albumin (BSA)
 - ◆ 100 NIH units / ml saline
 - ◆ 0.2 m フィルターでろ過滅菌して 0℃以下で保存
- ナイロンファイバー(T, B 細胞分離用)
- ツベルクリンシリンジ(1 ml)、注射針(21G)

【準備】

- 1) HBSS、RPMI 1640-5% FBS 又は McCoy's 5a 液-5%FBS を室温に戻す。
- 2) RPMI1640-5% FBS 又は McCoy's 5a 液-5% FBS の一部を 37℃で温め、残りを 4℃で冷やしておく。
- 3) 0.1g のナイロンファイバー をツベルクリンシリンジに均一になるように詰め、RPMI 1640-5% FBS を充填して恒温器(37℃)で温めておく。

【方法】

- 1) 比重遠心法で分離した 450 μ l のリンパ球浮遊液を恒温器で温めておいたナイロンファイバーカラムに充填して、注射針をゴム栓で栓をして、恒温器(37℃)で 30 分間インキュベートする。
- 2) 37℃で暖めておいた 10-15ml の RPMI1640-5% FBS をカラムに流し入れて T 細胞を回収する。
- 3) シリンジに 4℃で冷やしておいた RPMI 1640-5% FBS を加えて、ピストンで押し出す操作を繰り返して、B 細胞を回収する(10 – 15 ml)。

- 4) T細胞用チューブとB細胞チューブを2,000 rpm、1分間、室温で遠心する。
- 5) 上清を捨て、T細胞用チューブは2 ml、B細胞用チューブには500 μ lのRPMI1640-5% FBSを加えて、細胞数を 3×10^6 / mlに調整する。

【問題点と解決策】

問題点	解決策
B細胞浮遊液に多核球の混入	thrombin 処理*1
viability 不良	DNase 処理*2
	Serum albumin 浮遊*3
T、B細胞分離不良	カラムの洗浄が充分ではないナイロンファイバーを十分に梳いてカラムに充填

*1) Thrombin 処理：単球除去の方法に準じる

*2) DNase 処理：

- a. 1 ml リンパ球浮遊液($5-10 \times 10^6$ / ml)に0.4 ml DNase stock solution (2.75 mg/ml)を加えて恒温槽(37°C)で、5分間攪拌しながら反応させる。
- b. リンパ球浮遊液をHBSS-5%FBSで2回洗浄する。
- c. Fisher 遠心機で1,000g、3秒遠心して、上清を新しいチューブに移して細胞数と純度を再チェックする。
- d. 細胞浮遊液を0.4 ml BSA 溶液(30% BSA : HBSS = 6 : 5)に重層する。
- e. Fisher 遠心機で1,000g、1分間遠心すると、死細胞はBSA溶液の表面上、生細胞はチューブの底に沈殿する。
- f. 上清を捨て、沈殿している生細胞をHBSSに再浮遊させて2回洗浄する。
- g. 細胞数と純度を再チェックする。

*3) Serum albumin 浮遊：この方法は死細胞が低比重であることを利用して死細胞を除去する。

(6) モノクローナル抗体被覆ビーズによるリンパ球サブセット分離⁽⁹⁾

【目的】

- 或る特定の細胞表面抗原マーカーに対するモノクローナル抗体被覆マグネティックビーズを細胞浮遊液に加えて反応させて、標的細胞を結合したビーズを磁気装置で分離する(正の選択)。
- 或いは、目的とする標的細胞以外の細胞をビーズに結合させて、ビーズに未結合の細胞を分離する(負の選択)。
- 全血液から直接 T、B リンパ球を分離する方法があるが、比重遠心法で単核球を分離してから、T、B リンパ球を分離する方法を薦める。

【試料】

- 単核球浮遊液
 - ◆ Heparin Na 加血は、採血後 12 時間以内に分離すること
 - ◆ ACD (acid citrate dextrose) 或いは CPDA (citrate phosphate dextrose adenine)加血は、採血後 3 日以内に分離すること

リンパ節

脾臓

●

【試薬】

- Phosphate Buffered Saline (PBS)、pH=7.2、no Ca²⁺ or Mg²⁺
- Monoclonal antibody coated magnetic beads
- (Dynal Dynabeads. One Lambda Fluorobeads. B. Biotest Lymphobeads)
- RPMI 1640 - 2% heat-inactivated fetal bovine serum
- Acridine orange (AO)
- Ethidium Bromide (EB)
- Lyophilized bovine hemoglobin

【機器・備品】

- マグネット
- Rotator
- 蛍光顕微鏡

【準備】

- Acridine / Ethidium bromide dye (AO/EB) 保存液（発癌物質で取り扱いに要注意）
- Acridine Orange
- Ethidium bromide(暗所、室温保存)
- 15 mg AO と 50 mg EB を 1 ml エタノールで溶解し、49 ml PBS を加える（4℃保存は約 1 週間、-20℃保存は 6 カ月安定）。

【精度管理】

- ビーズは使用前に使用説明書に従ってビーズから遊離したモノクローナル抗体を除去する。
- 新 Lot のビーズを使用する時は、必ず旧 Lot のビーズも併用する。

【方法】

- 1) 抗凝固剤加末梢血から単核球を分離する。
- 2) 細胞沈殿物を 1.0 ml PBS に再浮遊させて、細胞数、viability をチェックする(viability が < 80%なら DNase 処理を行う)。
- 3) マグネティックビーズ量は細胞数に準じて加える(表 3)。
- 4) 1.5 ml 微量遠心チューブに 1.0 ml PBS と(3)で決定したマグネティックビーズを加える。
- 5) よく混和して、遠心チューブのキャップをしないでマグネットに接着させて、1 分間放置する。
- 6) 上清を捨て遠心チューブをマグネットから外してから細胞浮遊液を加えてキャップをして、低温下(8℃以下)で 5 分間、Rotator で回転させる。
- 7) 遠心チューブのキャップを外してからマグネットに接着させ、3 分間放置する。
- 8) 標的細胞を除いた浮遊液(正の選択)を捨てる、標的細胞浮遊液(負の選択)を新しいチューブに移す。
- 9) 遠心チューブをマグネットから外し、1 ml PBS を加えてビーズを再浮遊させる。
- 10) 遠心チューブのキャップを外してマグネットに取り付け、1 分間放置する。

- 11) 上清を捨て、9)、10)の操作を繰り返す。
- 12) 遠心チューブをマグネットから外し、(表 5)に示した培養液を加えて再浮遊させる。
- 13) 細胞数と viability を AO/EB、或いは 1-2-3 ドロップテクニック*1)で評価する。

*1)ドロップテクニック

h. Terasaki tray に細胞浮遊液を加える。

- 細胞浮遊液 1 μ l
- 細胞浮遊液 2 μ l
- 細胞浮遊液 3 μ l

i. AO/EB hemoglobin dye を各ウェルに 5 μ l加える。

j. 顕微鏡下で至適細胞濃度のウェルを決定する。

細胞数 ($\times 10^6$)	ビーズ量 (μ l)	培養液量 (μ l)	
		B cells	T cells
< 10	20	150	300
10 – 20	25	300	400
21 – 30	30	400	500
31 – 40	35	500	700

(表 5) 細胞数と加えるビーズ量、浮遊させる培養液量

【補足】

- 1) 蛍光色素
 - AO/EB の代わりに CFDA(carboxylfluorescein diacetate) / PI (propidium iodide) でも可で、特に CFDA は以下の特徴がある。
 - 細胞障害が起きる前に染色され、一旦細胞内に取り込まれるとエステル結合が切断されて色素が細胞膜に拡散しない。
 - AO より蛍光放出が強い。
 - AO. EB. PI は発癌性物質で取り扱いには十分な注意が必要である。

2) Quenching 試薬

- hemoglobin はバックが一定であるが、細胞の viability に影響を与えるので判定は検査後 3 日までは行う。

【問題点と解決策】

問題点	解決策
(1) 特定の細胞の染色	
AO は DNA だけではなく RNA にも結合して EB と同じ波長の蛍光を発するので、活性化リンパ球は赤色と緑色の蛍光を発する。	AO の代わりに CFDA 使用
(2) 蛍光強度が弱い	Quenching 濃度を下げる 光源を 50W から 100W
緑色蛍光強度が弱い	AO(CFDA)濃度を上げる
赤色蛍光強度が弱い	EB(PI)濃度を上げる
(3) 蛍光強度が強い	バックの蛍光が強いときは Quenching 濃度を上げる
緑色蛍光強度が強い	AO(CFDA)濃度を下げる
赤色蛍光強度が強い	EB(PI)濃度を下げる
(4) リンパ球の viability が悪い	Trypan blue. Eosin は EB. PI よりも分子量が大きいため細胞障害を高める傾向がある。採血してから長時間経過している時はビーズで分離する前に DNase 処理を行う
(5) 反応が弱い	リンパ球と血清の mixing ?
	細胞濃度 ?

【方法の限界】

この方法は細胞に発現している標的抗原量に依存しているため、白血病等の特定の疾患、免疫抑制剤投与中のレシピエントは細胞表面抗原量が負の調節を受けていることを考慮する必要がある。

【参考文献】

- 1) LM Jacobbi. ASHI Lab Manual .4th edition. vol. 1. I-A-1
- 2) BB. Nisperos. ASHI Lab Manual .4th edition. vol. 1. I-A-3
- 3) PI. Terasaki. UCLA Tissue Typing Manual. 1987
- 4) M. Fotino. ASHI Laboratory Manual 4th edition. vol. 1. 1-A-6
- 5) JA. Danilovs. Histocompatibility Testing . 1980 ; 287
- 6) SS. Karuppan. Transplantation 1990 ; 49 : 510
- 7) LM. Karpinski. J Am Sco Nephrol 2001;12:2807. Le Bas-Bernardet. Transplantation 2003 ; 75 : 477
- 8) B. Dupont. Tissue Antigens 1972 ; 2 : 141
- 9) JA. Hackett. ASHI Laboratory annual 4th edition. vol. 1. 1-A-5

(7) リンパ球クロスマッチ

【目的】

- リンパ球クロスマッチ(XM)はドナー(allogeneic XM)、自己(auto XM)に特異的なリンパ球細胞障害性抗体を検出することを目的とする。
- 表(forward)XM はレシピエント候補の血清とドナーの単核球細胞を標的細胞とする。裏(reverse)XM はドナー血清とレシピエント候補の単核球細胞を標的細胞とする。
- 標的細胞は全リンパ球、T細胞、B細胞を用いる。
- AHG 法は T リンパ球クロスマッチの検出感度を上げるために行う。B リンパ球クロスマッチは、B リンパ球は Fc レセプターを細胞膜表面に発現しているので AHG が結合して偽陽性反応となるので行わない。

【試料】

- PBL (全リンパ球) : > 80 % viability
- T リンパ球 : > 80 % viability
- B リンパ球 : > 80 % viability

【試薬、消耗品】

- RPMI (細胞洗浄用)
- FBS/RPMI-2.5% (細胞希釈、細胞浮遊液用)

- コントロール試薬 —購入後適量に分注し-70° で保存—
 - ◆ ALS(抗リンパ球血清)：陽性コントロール
 - ◆ ABS(抗B細胞血清)：B細胞陽性コントロール
 - ◆ PHS(プールヒト血清)：陰性コントロール
- 家兎補体（クラスI、クラスII補体）
- AHG（Goat IgG 抗 human kappa light chain IgG 分画）
- 染色液：水溶性 Eosin Y
- 固定液：ホルムアルデヒド(ホルマリン)
- ミネラルオイル
- テラサキトレイ(60穴或いは72穴トレイ)
- カバーガラス

【機器、備品】

- 倒立位相差顕微鏡
- 明視箱
- マイクロピペット(1 μ l、5 μ l)
- テラサキシリンジ & ディスペンサー（1/50 μ l、5/250 μ l）
- 恒温器（ふ卵器）
- 分注用ピペット（ミネラルオイル、エオジン、ホルマリン）

【試薬調整】

J. 補体の分注

- 1) 37°Cで溶解し、適量(1 ml と 2 ml)に分注して、-80°Cで保存する。
- 2) 5% Eosin 溶液

5 g の水溶性 Eosin Y を 100 ml 蒸留水に溶かし、フィルターでろ過する。
- 3) 0.5% Phenol Red 溶液

0.5 g の Phenol Red を 3 ml の 1N NaOH に溶かし、溶解後蒸留水で 100 ml に調整する。
- 4) 平衡化ホルマリン

500 ml のホルムアルデヒドに 2 ml の 0.5% Phenol Red 溶液を加え、使用時に 0.2N NaOH で pH 7.2 - 7.4 に調整する(淡いピンク色)。

5) Anti-human globulin (AHG) 希釈液

AHG は最適濃度^(*1)になるように希釈して使用する。

K. AHG-補体最適濃度の検定

AHG-CDC 法の補体は希釈して使用しなければ、AHG 効果を阻害する。

- 1) 抗血清を希釈系列してトレイに $1\mu\text{l}$ 分注する。
- 2) T リンパ球を $1\mu\text{l}$ 分注して、1 時間、室温で反応させる。
- 3) 遠心後、“flick”で上清を完全に除去する。
- 4) AHG 希釈液 (0、1:25、1:50、1:100、1:100、1:200、1:200、1:400、1:800) $1\mu\text{l}$ をウェルに加えて、正確に室温で 1 分間反応させる。
- 5) 希釈補体液(1:0、1:1.5、1:2、1:4、1:8)を $5\mu\text{l}$ 加えて、室温、2 時間反応させる。
- 6) 染色後、顕鏡で最も細胞障害性の強い AHG、補体希釈系列を調べる。
通常、補体原液(1:0)、AHG 濃度が高いウェルは細胞障害性が弱い。

L. AHG-C'混合液の簡便法

[例] AHG 最適濃度 : 1:400、補体最適濃度 : 1:1.5

- 1) AHG 原液を $5\mu\text{l}$ ずつ分注して -80°C で保存する。
- 2) 使用時、溶解して RPMI $200\mu\text{l}$ 加えて、1/40 倍希釈 AHG 溶液とする。
- 3) 補体 1.0 ml に RPMI 0.35 ml 加えて、補体希釈液とする。
- 4) 補体希釈液に 1/40 倍希釈 AHG 溶液 1.5 ml 加えると、最終補体希釈は 1:1.5、最終 AHG 希釈は 1:400 となる。

【精度管理】

- 被検サンプルと同時に陽性、陰性コントロールを検査しなければならない。
- 標準試薬の精度管理を実施するべきで、結果を文書化しなければならない。

【方法】

- 標的細胞と反応条件
 - ◆ 全リンパ球(PBL)
 - ◆ T リンパ球
 - ◆ B リンパ球

- 反応温度条件
 - ◆ 4°C(B リンパ球は必須ではない)
 - ◆ 22°C(室温)
 - ◆ 37°C

- 反応時間

標的細胞	血清反応	補体反応
全リンパ球(PBL)	30 分	1 時間
T リンパ球	1 時間	2 時間
B リンパ球	1 時間	2 時間

- 標的細胞調整

全リンパ球 (PBL)、T リンパ球、B リンパ球は、RPMI- 5% FBS で $2 \sim 3 \times 10^6/\text{ml}$ に調整する。

- クロスマッチトレイの準備

- 1) 凝固血をブレーキ[off]で 2500rpm. 5 分遠心して血清分離する。クロスマッチに使用しない血清は-70°C保存する。
- 2) トレイに XM#. tray#. 血清反応時間、ID#. Date 等をラベルする(72 ウェルトレイを推薦する)。
- 3) トレイの各ウェルにピペットディスペンサーで $5 \mu\text{l}$ のミネラルオイルを分注し、血清の準備ができるまで 4°Cで保存しておく(ミネラルオイルは血清の乾燥を防ぐ)。
- 4) 被検血清、コントロール血清を RPMI-5% FBS で、原液、X1、X2、X4、X8 倍希釈する。
- 5) それぞれの血清 $1 \mu\text{l}$ をトレイウェルに、duplicate 或いは triplet に分注する。

(注意)

- 血清のキャリーオーバーを防ぐために、陰性血清から陽性血清、X8 倍希釈から X1 倍希釈血清に分注する。
- 分注に使用するシリンジは使用前後に蒸留水で最低 10 回洗浄する。
- 6) 明視箱で血清がオイル下に滴下されているかをチェックする。

7) 標的細胞の準備ができるまで4℃で保存し、24時間以内に使用する。

(8) Standard 法、Extended incubation 法によるクロスマッチ⁽¹⁾

- 1) トレイを室温に戻す(通常、5~15分)。
- 2) 1μℓの細胞浮遊液をシリンジニードルが血清に接触しないように各ウェルに加える。

血清のキャリーオーバーを防ぐ方法

- 陰性血清から陽性血清、X8倍希釈からX1倍希釈血清に分注する。
 - 細胞浮遊液をミネラルオイル上に勢いよく撃ち込む(シューティング方式)
 - ミネラルオイル上に細胞浮遊液を乗せる(ソフトドロップ方式)
- 3) 血清と細胞浮遊液を高周波ジェネレーター、マイルドミキサー等で、良く混和する。
 - 4) 血清反応は以下の温度、時間で行う。

標的細胞	温度	反応時間
全リンパ球 (PBL)	22℃(室温)	30分
Tリンパ球 (Tr)	22℃(室温)	1時間
Tリンパ球 (Tw)	37℃	1時間
Bリンパ球 (Br)	22℃(室温)	1時間
Bリンパ球 (Bw)	37℃	1時間

5) PBL、Tリンパ球トレイにはクラスI補体、Bリンパ球トレイはクラスII補体をソフトドロップ方式でそれぞれ5μℓ加え、血清、細胞浮遊液と補体を高周波ジェネレーター、マイルドミキサー等で、良く混和する。

6) 補体反応は以下の温度、時間で行う。

標的細胞	温度	反応時間
全リンパ球 (PBL)	22℃(室温)	1時間
Tリンパ球 (Tr)	22℃(室温)	2時間
Tリンパ球 (Tw)	22℃(室温)	2時間
Bリンパ球 (Br)	22℃(室温)	2時間
Bリンパ球 (Bw)	22℃(室温)	2時間

- 7) 5%エオジン溶液をソフトドロップ方式で2μℓ加えて、5分間反応させる。
- 8) 平衡化ホルマリンを10μℓ加えて、反応を停止する。

- 9) トレイにカバーグラスを乗せ、少なくとも 15 分静置させて、倒立位相差顕微鏡で判定する。翌日に判定する場合は乾燥するのを防ぐために湿潤箱に入れて保存する。

(9) Antiglobulin crossmatch (AHG) 法によるクロスマッチ⁽²⁾

- 1) トレイを室温に戻す(通常、5~15分)。
- 2) 1 μ lの細胞浮遊液をシリンジニードルが血清に接触しないように各ウェルに加える。

血清のキャリーオーバーを防ぐ方法

- 陰性血清から陽性血清、X8倍希釈からX1倍希釈血清に分注する。
 - 細胞浮遊液をミネラルオイル上に勢いよく撃ち込む(シューティング方式)
 - ミネラルオイル上に細胞浮遊液を乗せる(ソフトドロップ方式)
- 3) 血清と細胞浮遊液を高周波ジェネレーター、マイルドミキサー等で、良く混和する。
 - 4) 血清反応は以下の温度、時間で行う。

標的細胞	温度	反応時間
Tリンパ球 (Tr)	22°C(室温)	1時間
Tリンパ球 (Tw)	37°C	1時間

- 5) RPMI で2回洗浄を行い、3回目は、RPMI -2.5%FBS で洗浄する。
- 6) RPMI 10 μ lを加え、遠心(1000 rpm. 1分)する。
- 7) 上清を”flick”で除去する。
- 8) (6)、(7)のステップを繰り返す。
- 9) RPMI 1-2.5%FBS 10 μ lを加え、遠心後”flick”で、上清が残らないように完全除去する。
- 10) 希釈抗ヒトグロブリン(AHG) 1 μ lを加えて、正確に1分後に補体 5 μ lを加える。
- 11) 補体反応は以下の温度、時間で行う。

標的細胞	温度	反応時間
Tリンパ球 (Tr)	22°C(室温)	2時間
Tリンパ球 (Tw)	22°C(室温)	2時間

- 12) 5%エオジン溶液をソフトドロップ方式で2 μ l加えて、5分間反応させる。

- 13) 平衡化ホルマリンを 10 μ l 加えて、反応を停止する。
- 14) トレイにカバーグラスを乗せ、少なくとも 15 分静置させて、倒立位相差顕微鏡で判定する。翌日に判定する場合は乾燥するのを防ぐために湿潤箱に入れて保存する。

【判定と陽性基準】

- 1) Crossmatch Tray Format worksheet とトレイの整合性を確認する。
- 2) トレイの raw 1(wells A-F). raw 2(wells F-A)の順に倒立蛍光顕微鏡で、目視判定する。
- 3) 結果は Crossmatch Tray Format worksheet に記入する。
- 4) スコアと死細胞率は ASHI Standards for Histocompatibility Testing に準じる。

Score	死細胞率	判定
1	0 – 10 %	陰性
2	11 – 20 %	陽性
4	21 – 50 %	陽性
6	51 – 80 %	陽性
8	81 – 100 %	陽性
0	n/a	判定不能

- 5) 陰性コントロールは反応している状態をそのままスコア化して表記し、他のウェルは陰性コントロールを差し引いてスコア化して表記する。
- 6) 「クロスマッチ陽性」は陰性コントロールよりもスコア 2 (11%) 以上とする。
- 7) 「クロスマッチ陰性」は陰性コントロールよりもスコア 2 (11%) 未満とする。
- 8) コントロールは下記の条件に当てはまるものとする。
 - 陰性コントロールは、viability 80%以上のリンパ球で、スコア 2 或いはそれ以下である。
 - 陽性コントロールは、スコア 4 或いはそれ以上である。

【注釈】

- 温度条件：温度条件をかえることにより真の反応性を確認することができ

る。CYNAP 反応を除いて、真の陽性反応は強度を保ち、一般的に温度条件が上がるほど反応性と力価は上昇する。

- 再検査：下記の条件の時は管理責任者に通知して再検査の判断を委ねる。
 - ◆ 陰性コントロールで死細胞率が高く、細胞の viability 不良の時
 - ◆ 陽性コントロールが予想に反して低い時

【方法の限界】

- 1) 細胞濃度は抗体検出感度を最大限に引き出す濃度にしなければならない。特に高濃度の細胞数は弱陽性の抗体を検出できない。
- 2) AHG 濃度は抗体検出感度と密接に関連するので、AHG 最適濃度を ”試薬調整 (5) を参照して決定しなければならない。
- 3) 細胞障害性によるクロスマッチは、HLA 特異的抗体以外のリンパ球 non-HLA 抗体にも陽性反応を呈するので、両者の区別ができない。
- 4) レシピエントの感作歴、診断歴を把握することが重要である。
- 5) AHG は抗ヒト L 鎖 κ 型と抗ヒト L 鎖 λ 型の両方を使用したほうがよいとされている

(10) IM beads XM

T and B lymphocyte crossmatches using immunomagnetic beads⁽³⁾

【目的】

- IM beads XM は補体依存性細胞障害試験の延長にある方法である。
- リンパ球分離に要する時間を 1/2 に短縮できる。
- リンパ球分画の純度が高い。
- リンパ球分画の生死判定が容易で正確である。

【試料】

- T リンパ球
- B リンパ球

【試薬】

- Phosphate Buffered Saline (PBS)、pH=7.2、no Ca²⁺ or Mg²⁺

- 2.5%FBS/RPMI (細胞希釈、細胞浮遊液用)
- コントロール試薬 ー購入後適量に分注し-70° で保存ー
 - ALS(抗リンパ球血清) : 陽性コントロール
 - ABS(抗B細胞血清) : B細胞陽性コントロール
 - PHS(プールヒト血清) : 陰性コントロール
- 家兔補体
- Acridine (AO)
- Ethidium bromide (EB)
- Lyophilized bovine hemoglobin
- ミネラルオイル
- テラサキトレイ(60穴或いは72穴トレイ)

【準備】

- Acridine / Ethidium bromide dye (AO/EB) 保存液(発癌物質で取り扱いに要注意)
- Hemoglobin Quench 溶液
 - ◆ Lyophilized bovine hemoglobin
 - ◆ 2% EDTA-PBS
 - ◆ 1% Sodium Azide

10g bovine hemoglobin を 100 ml、2% EDTA-PBS に溶解して 1 ml sodium azide を加え、1.000 g、30 分間遠心する。上清を捨て、沈殿物を -20°C で保存(1 週間なら 4°C 保存可)。
- AO / EB – Hemoglobin Quench 溶液

◆ AO / EB 保存液	0.2 ml
◆ Hemoglobin Quench	6.5 ml
◆ DW	3.5 ml

4°C で保存 (1 週間有効)

【機器、備品】

- テラサキシリンジ & ディスペンサー (1 / 50 μ l、5 / 250 μ l)
- 恒温器 (ふ卵器)
- 蛍光顕微鏡

- 分注用ピペット (AO / EB-Hemoglobin Quench 溶液)

【精度管理】

- IM beads の精度を確認するために、新 Lot と同時並行で旧 Lot を使用するべきである。
- クロスマッチは ALS. NHS. RPMI. ABS も同時並行で行うべきである。
- 不適当と考える細胞分離は ABS ウェルで確認することができる。
 - T リンパ球浮遊液が >10%
 - B リンパ球浮遊液が <80%
- RPMI ウェル、NHS ウェルで、>10%の時は補体、beads による細胞障害による非特異的反応と考える。

【方法】

- 標的細胞と反応条件
 - ◆ 全リンパ球(PBL)
 - ◆ T リンパ球
 - ◆ B リンパ球
- 反応温度
 - ◆ 4°C(B リンパ球は必須ではない)
 - ◆ 22°C(室温)
 - ◆ 37°C
- 反応時間

クロスマッチ	IM Bead	Pos/Neg selection	血清反応	補体反応
全リンパ球(NIH)	CD8+&CD19+	Pos Lmp	30 分	1 時間
T リンパ球(NIH)	CD8+(CD2+)	Pos. T	30 分	1 時間
T リンパ球(extended)	CD8+(CD2+)	Pos. T	1 時間	2 時間
T リンパ球(AHG)	CD8+(CD2+)	Pos. T	30 分	1 時間
B リンパ球	CD19+(DR+)	Pos. B	1 時間	2 時間

- 標的細胞調整

全リンパ球 (PBL)、Tリンパ球、Bリンパ球は、RPMI- 5% FBS で $2 \sim 3 \times 10^6/\text{ml}$ に調整する。

- クロスマッチトレイの準備

- 1) 凝固血をブレーキ[off]で 2500rpm. 5分遠心して血清分離する。クロスマッチに使用しない血清は-70℃保存する。
- 2) トレイに XM#. tray#. 血清反応時間、ID#. Date 等をラベルする(72ウェルトレイを推薦する)。
- 3) トレイの各ウェルにピペットディスペンサーで $5\mu\text{l}$ のミネラルオイルを分注し、血清の準備ができるまで4℃で保存しておく(ミネラルオイルは血清の乾燥を防ぐ)。
- 4) 被検血清、コントロール血清を RPMI-5% FBS で、原液、X1、X2、X4、X8 倍希釈する。
- 5) それぞれの血清 $1\mu\text{l}$ をトレイウェルに、duplicate 或いは triplet に分注する。

【注意】

- 血清のキャリーオーバーを防ぐために、陰性血清から陽性血清、8 倍希釈から X1 倍希釈血清に分注する。
- 分注に使用するシリンジは使用前後に蒸留水で最低 10 回洗浄する。
- 明視箱で血清がオイル下に滴下されているかをチェックする。
- 標的細胞の準備ができるまで4℃で保存し、24 時間以内に使用する。

蛍光法によるクロスマッチ

- トレイを室温に戻す(通常、5~15分)。
- $1\mu\text{l}$ の細胞浮遊液をシリンジニードルが血清に接触しないように各ウェルに加える。

血清のキャリーオーバーを防ぐ方法

- 1) 陰性血清から陽性血清、X8 倍希釈から X1 倍希釈血清に分注する。
- 2) 細胞浮遊液をミネラルオイル上に勢いよく撃ち込む(シューティング方式)
- 3) ミネラルオイル上に細胞浮遊液を乗せる(ソフトドロップ方式)
- 4) 血清と細胞浮遊液を高周波ジェネレーター、マイルドミキサー等で、良

く混和する。

- 5) 血清反応は以下の温度、時間で行う。

標的細胞	温度	反応時間
全リンパ球 (PBL)	22°C(室温)	30分
Tリンパ球 (Tr)	22°C(室温)	1時間
Tリンパ球 (Tw)	37°C	1時間
Bリンパ球 (Br)	22°C(室温)	1時間
Bリンパ球 (Bw)	37°C	1時間

- 6) PBL、Tリンパ球トレイにはクラスI補体、Bリンパ球トレイはクラスII補体をソフトドロップ方式でそれぞれ5 μ l加え、血清、細胞浮遊液と補体を高周波ジェネレーター、マイルドミキサー等で、良く混和する。

- 7) 補体反応は以下の温度、時間で行う。

標的細胞	温度	反応時間
全リンパ球 (PBL)	22°C(室温)	1時間
Tリンパ球 (Tr)	22°C(室温)	2時間
Tリンパ球 (Tw)	22°C(室温)	2時間
Bリンパ球 (Br)	22°C(室温)	2時間
Bリンパ球 (Bw)	22°C(室温)	2時間

- 8) AO / EB-Hemoglobinn Quench 溶液 5 μ lをソフトドロップ方式で加える。

- 9) 蛍光顕微鏡で判定する。

生細胞：緑色に染色 (Acridine Orange)

死細胞：赤色に染色 (Ethidium Bromide)

- 10) 染色後 24 時間までは判定可能であるが、細胞の viability が悪くなり、バックが高くなる

【判定と陽性基準】

standard 法、extended incubation 法、AHG 法の判定と陽性基準参照

【トラブル解決】

- 献腎或いは採血後 3-4 日経過した血液は、ficoll 液を使ってリンパ球を分離し、cold PBS 5ml に再浮遊させてから IM bead による分離を行う。

- ドナーがウイルス感染している時は CD8⁺ beads を使用してはならない。
- CD8 はウイルスによって活性化された T 細胞を分離してクロスマッチ判定が困難になる。このような時は CD2⁺ beads 或いは Neg. selection T を用いる。
- 末梢血から分離したリンパ球分画に単球、顆粒球がみられる時は鉄粒子を加えて取り除く。

(11) Flow cytometric crossmatch (FCXM) (4)

【原理・目的】

- Flow cytometry の基本原理
 - ◆ 一つの細胞に結合する蛍光量(蛍光強度)は、その細胞の表面抗原量に比例する。
 - ◆ 細胞表面抗原に結合する抗体量は、その細胞表面抗原量に比例する。
 - ◆ 細胞に結合する蛍光量(蛍光強度)は、細胞表面抗原に結合する抗体量を反映する。
- FCXM は移植予後の危険因子である LCT 法では検出できないドナー特異的抗体を検出する(5)。
- 初回移植、未感作症例の FCXM 陽性症例については、移植予後との関連性は評価が分かれているが 6、7、8)、再移植、高感作歴症例は移植後早期のグラフトロスの危険因子であると考えられる(9.10)。
- FCXM はドナーリンパ球とレシピエント血清を反応させて、蛍光標識抗ヒト免疫グロブリンで検出する間接免疫蛍光法である。
- FCXM は蛍光標識 CD3、CD19(CD20)抗体を加えることにより、T リンパ球或いは B リンパ球に反応する抗体を検出することができる。
- FCXM はドナー細胞と細胞表面抗原に結合した抗体の散乱光と蛍光の光信号を電気信号に変換して、0~1023 の 1024 分割されたチャンネル値の相対蛍光強度として表示する。
- FCXM の結果判定は中央チャンネル蛍光強度 (MCFI、Median Channel Fluorescence Intensity) 或いは、可溶性蛍光色素分子等量 (MESF、Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome) を基にして判定する。

【試料】

- ドナーリンパ球は >80% viability
 - 1) 採血後 24 時間以内の室温保存された ACD (或いは heparin Na) 加血
 - 2) RPMI で保存されたリンパ節、脾臓
 - 3) 凍結リンパ球は viability が良ければ使用してもよいが、DNase 処理を行うこと
- 血清
 - 4) レシピエント血清
 - 5) ドナー血清 — ドナー自己コントロール

【試薬・消耗品】

- Wash buffer : PBS with 0.1% NaN₃. 5%FCS
 - 1) PBS 100ml に NaN₃ 0.1g を加える (PBS Azide) 。
 - 2) PBS Azide 100ml に FCS 5ml 加える。
- コントロール血清
 - 1) 陰性コントロール血清 : 男性、AB 型の健常ヒト血清(NHS) : PBS と同じ蛍光 shift の血清を用いる。
 - 2) 陽性コントロール血清 : pooled PRA(+)血清 : 原液と陰性血清の上限 shift 以上の希釈血清を用いて、弱陽性のボーダーラインを把握する。
- 蛍光標識抗体
 - 1) 蛍光標識 2 次抗体 : FITC-Goat (Fab)₂ α human IgG (Fc specific) : 検定後 1 年有効で 20 μl 分注、遮光して -70℃ 保存
 - 2) 抗ヒト T 細胞抗体 : PE-CD3 (PerCP-CD3) : 遮光して 4℃ 保存
 - 3) 抗ヒト B 細胞抗体 : PE-CD19 (PE-CD20) : 遮光して 4℃ 保存
- 1% Formaldehyde solution : 10% formaldehyde(stock solution)を 1 : 10 の割合で PBS Azide で希釈する(遮光して 4℃ 保存、 1 か月安定)。
- 12x75mm Polystyrene Falcon tubes

【機器、備品】

- 真空吸引システム
- Vortex Grnie Mix
- 冷却遠心機
- Flow Cytometer

- Pipettes : 10 μ l - 100 μ l
- Repeating dispensers : 500 μ l - 5 ml

【精度管理】

- FCXM は検出感度は鋭敏なので、試薬、装置には特に厳密な精度管理が必要である。
- 細胞数、血清希釈、分量は厳密、且つ正確でなければならない。
- 陰性コントロール血清
 - 1) 非特異染色が低い血清を選択しなければならない。
 - 2) 新 Lot に変更する時はカットオフ値を正常細胞で検討しなければならない。
 - 3) カットオフ値は NHS と 30-50 人の細胞の中央チャンネル値 (MFI) の平均値 + 2SD を用いるが、+2.5SD. +3SD を採用している施設もある。
- 陽性コントロール血清(PS)
 - 1) Bw4.Bw6 に反応する抗血清をプールして用いる。
 - 2) 原液と陰性血清の上限 shift 以上の希釈血清を用いて、弱陽性のボーダーラインを把握する。
- 蛍光標識 2 次抗体は NHS の最も低い median peak channel と PS の最も高い median peak channel が得られる希釈倍率を検定する。
- 蛍光標識 2 次抗体はマウス等と交差反応がないことをマウス血清、牛胎児血清で確認する。
- 新 Lot の CD3. CD19 抗体を使用する時は旧 Lot の抗体と同時並行で検討する。

【方法】

- 1) 抗凝固剤加血、リンパ節、脾臓から単核球を分離するのは比重液(Ficoll) 法を選択する。Lympho-Kwik™. Percol は偽陰性の原因となる。
- 2) 細胞数を 1.6×10^7 /ml in PBS Azide に調整する。
- 3) 検査する全ての血清は使用前に免疫グロブリン塊と免疫複合体を除くために airfuge する。免疫グロブリン塊と免疫複合体は B 細胞の FcR に結合して非特異的染色が高くなる。
- 4) 12x75 Falcon tube にラベリングする (テクニックのバロメータになる

ので in duplicate で行う)。

- ◆ NHS(Normal Human Serum)
- ◆ Buffer control
- ◆ Donor auto. control serum
- ◆ PS(Positive Serum)

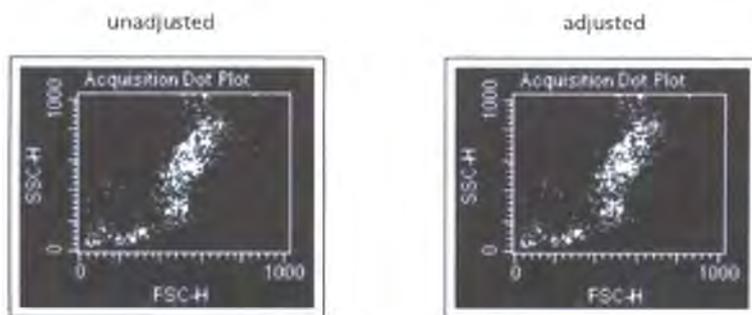
- 1) Patient serum
 - 2) 細胞液 30 μ l (500.000 cells)をチューブに分注する。
 - 3) 血清 30 μ l を加え、vortex する。
 - 4) 室温で 20-30 分反応させる。
 - 5) 冷 PBS Azide- 5% FCS を 3ml 加え、遠心する(500G. 5 分. 4°C)。
 - 6) 上清を吸引し、step 8 を 2 回繰り返す(残渣は >30 μ l)。
 - 7) FITC- α human IgG 希釈液を 100 μ l 加えて、vortex する。
 - 8) 標識抗 CD3. CD19(CD20)抗体を 20 μ l 加えて、vortex する。
 - 9) 遮光して氷上で 30 分反応させる。
 - 10) 冷 PBS Azide- 5% FCS を 3ml 加えて、洗浄を 2 回繰り返す。
 - 11) 上清を吸引し、沈査を vortex しながら、1% formaldehyde を 500 μ l 加える。
 - 12) 直ちに Flow cytometer で測定する(4°Cで遮光、保存すれば7日まで可)。
 - 13) aquisition/analysis は 10.000-15.000 "gated" リンパ球を選択する。
- この設定で、>1000 T リンパ球、 >1000 B リンパ球の解析が可能である。
 - 機器設定を含めた template file を前もって作成しておく。

【機器設定】

機器設定は BD FACStation™ Software (V6.03. BD)に従った。

- CaliBRITE ビーズによる機器設定(PMT 電圧、蛍光漏れ補正、感度試験を定期的に行う。
 - 1) FSC (前方散乱光)と SSC (側方散乱光)のビーズ信号とノイズを分離する。
 - 2) FL1(FITC)、FL2(PE. PI)、FL3(PerCP)検出器の蛍光信号と未標識ビーズの自家蛍光信号を分離する。
 - 3) 細胞は CaliBRITE ビーズと光学的特性が異なるために、CaliBRITE ビーズによる機器設定後、実際に測定する細胞を用いて機器微調整を行うことが重要である。

- FSC、SSC 検出器の電圧、アンプゲイン調節と FL1、FL2 検出器の電圧調整と蛍光四分画マーカ設定する。
- 試料
 - 1) 陰性血清 (NHS)
 - 2) 陽性血清 (PS)
- 蛍光標識抗体
 - 1) FITC- α human IgG
 - 2) PE – CD19
 - 3) PerCP – CD3
 - 4) FITC- α human IgG / PE – CD19 / PerCP – CD3
- FSC・SSC 検出器の電圧、Amp Gain、FSC Threshold を調節する (図 1) 。
 - 1) FSC、SSC Amp Mode : LIN Amp Mode を選択する。
 - 2) 測定するリンパ球集団がプロット内の適切な位置に入るよう FSC の Amp Gain を調節して、解像度に応じて 1024、256 チャンネル表示する。
 - 3) SSC Amp Gain、Voltage を調節
 - 4) FSC の Threshold 値を設定して、測定に不必要な細胞集団とノイズを除去する。

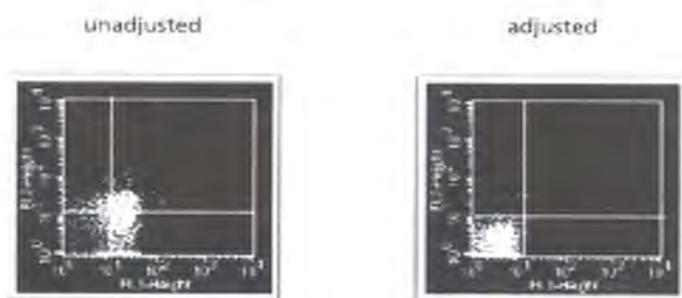


(図 2) FSC、SSC 及び FSC Threshold の調整

- 5) リンパ球ゲート設定 (R1)
- 6) FL1、FL2、FL3 検出器の電圧調節
 - a. 細胞の自家蛍光量、FcR による非特異的結合による蛍光量は、細胞の種類により異なるので、FL1、FL2、FL3 検出器の電圧はゲート内のリンパ球集団について subclass control 血清を用いて調整する必要がある。
 - b. X、Y パラメーターをそれぞれ、FL1 vs FL2、FL3 vs FL2 ドットプロ

ットを選択して、ゲートを G1=R1 に設定する。

- c. FL1、FL2、FL3 Amp mode : LOG Amp Mode を選択する（弱陽性細胞集団と陰性集団を明確に区分するために）。
- d. ゲート内のリンパ球集団がプロット内の適切な位置にくるように FL1、FL2、FL3 検出器の電圧を調節する。
- e. Quad LL*1 % Gate が 95.00 ~ 99.99 の範囲に入るように蛍光四分画マーカーを設定する(図 3)。

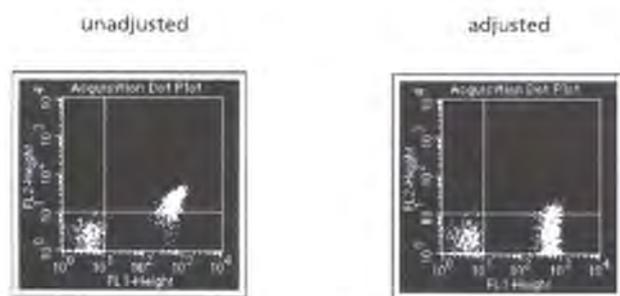


(図 3) 蛍光四分画マーカー設定

(*1) Quad LL : ドットプロット左下 (Left Low) Quadrant

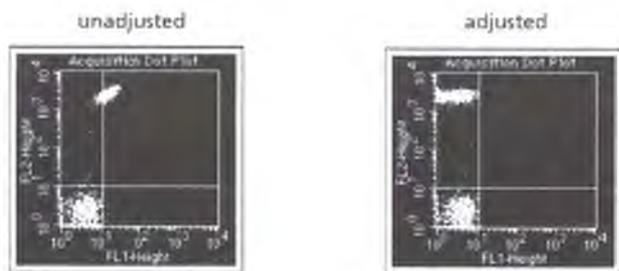
1) Fluorescence compensation (蛍光漏れ補正)

- f. 目的としない検出器に漏れ込む蛍光を微調整する。FL1 vs FL2 ドットプロット上の FITC 陽性リンパ球集団を Quad LR 内の適切な位置にくるように FL2 - % FL1 を調節する(図 4)。



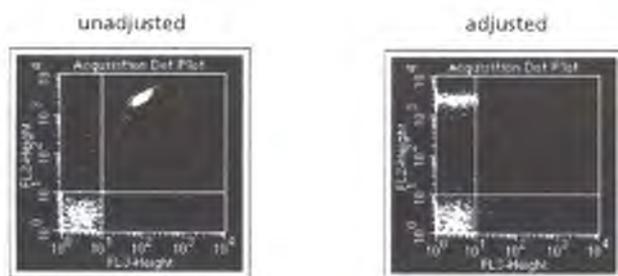
(図 4) Fluorescence compensation (FL1 vs FL2)

- g. FL1 vs FL2 ドットプロット上の PE 陽性リンパ球集団を Quad LR 内の適切な位置にくるように FL1-%FL2 を調節する(図 5)。



(図 5) Fluorescence compensation (FL1 vs FL2)

- FL3 vs FL2 ドットプロット上の PE 陽性リンパ球集団を Quad LR 内の適切な位置にくるように FL3 - % FL2 を調節する。



(図 6) Fluorescence compensation (FL3 vs FL2)

【結果】

(図 7) FCXM 256 linear scale

左図：単核球のリンパ球ゲート(R1 gate)の前方散乱光(FSC)、側方散乱光(SSC)のドットプロット

中図： R1 リンパ球ゲート内の T 細胞(R2 gate)の FSC、FL-2(CD3 PE) のドットプロット

右図： R2 T 細胞の FL-1(抗ヒト IgG FITC)ヒストグラム

【結果・判定】

NHS. レシピエントそれぞれの中央チャンネル蛍光強度 (MCFI)の平均値を計算する。

1) レシピエントと NHS の平均 MCFI より、

[レシピエントの MCFI] – [NHS の MCFI] : Linear value

- ◆ 陰性血清の蛍光強度差を直接求めるので、微細な強度の差を検出する。
- ◆ 測定時の感度設定に依存するので、蛍光強度の継時的変化を比較することはできない。

2) [レシピエントの MCFI] / [NHS の MCFI] : Log value

陰性血清との割合を求めるので、蛍光強度の継時的変化を比較する場合に適している。

3) [レシピエントの MESF] – [NHS の MESF]

蛍光強度を定量化する。

- 各施設毎に陽性基準を作ることが重要である。
- FCXM を評価する場合に精度管理の基準を設けることが重要である。但し、下記の基準を外れていてもデータを無効にする必要はないが、管理責任者の見解を仰ぐべきである。
 - ◆ duplicate の差が±5 (256 channel). ±30 (1024 channel)の範囲内である。
 - ◆ NHS. PS の MCS が所定の範囲内である。
 - ◆ NHS と PS 間の MCFI、或いは Ratio は許容範囲の最下限とする。
 - ◆ 細胞の>90%が解析用 gate 内に納まっている。
 - ◆ CD3 と CD19 の duplicate の差は、< 10 %、できれば < 5 %とする。

【注釈】

- 本法は細胞液 30 μ l に血清 30 μ l を加えているので、血清は 1/2 倍希釈である。
- 洗浄過程が不十分だと偽陰性の結果を招くことがある。容量の小さいチューブで行う場合は、洗浄液も少量になるので十分に注意する。
- 血清と細胞数の割合はクロスマッチの結果に大きく影響し、特に過剰の細胞数は偽陰性の結果となる。
- FITC 標識 抗ヒト IgG の希釈が不正確の場合、コントロールと被検血清の MCFI が設定範囲外に出てしまうので注意する。

【方法の限界】

- FCXM は検出感度が高いために偽陽性率も増えるので、未感作の初回移植では臨床との関連性がみられないと言われている。
- しかし、再移植、高感作例では CDC 法では検出できない低レベルの抗体を検出することが可能で有益な情報を提供することができる。
- FCXM の結果と PRA を組み合わせて判定することにより、偽陽性率を 16 % から 9 % に減少させることができる(11)。
- FCXM は陽性基準を臨床との関連で再評価することにより、CDC 法では検出できない感作歴のあるレシピエントを評価することができる(12)。

【文献】

- 1) KA. Hopkins. ASHI Laboratory Manual .4th edition. vol 1. I-C-1
- 2) PA. Saiz . ASHI Laboratory Manual .4th edition. vol. 1. I-C-9
- 3) S. Vaidya , ASHI Laboratory Manual .4th edition. vol. 1. I-C-12
- 4) CW. Hamrick. ASHI Laboratory Manual .4th edition. vol. 2. VI-B-4
- 5) MR. Garovoy. Transplant Proc 1983;15:1939
- 6) DJ. Cook. Clin Transpl 1987; 1: 253
- 7) JC. Scornik. Transplantation 1994; 57: 621
- 8) AJ. Berteli. AJ Clin Transpl 1992; 6: 31
- 9) RJ. Mahoney. Transplantation 1990; 49: 527
- 10) CF. Bryan. Transplantation 1998; 66: 182
- 11) RJ. Mahoney. Transplantation 1990 : 49 : 527
- 12) S. Limaye. Transplantation 2009 ; 87 : 1052

(12) IgM 抗体の不活化⁽¹⁾

【目的】

- IgG と IgM 抗体は細胞に結合して補体系を活性化し細胞障害を引き起こす補体結合性抗体である。
 - ◆ IgG 抗体は二つの抗原結合部位をもった Y 字型の単量体である。
 - ◆ IgM 抗体は 5 本の Y 字型分子がそれぞれ S-S 結合で結合し、さらに J 鎖に結合した五量体で、補体系活性化の効率がよい。
- 抗 HLA 抗体は移植、輸血、妊娠により感作されて産生され、IgG が一般的であるが、自己抗体は自己抗原に対する抗体で、一般的に IgM である。
 - ◆ SLE(systemic lupus erythematosus. 全身性紅班狼瘡)が原因でグラフトロスになったレシピエントは自己の多種の核酸、蛋白(nucleosome. ribosome. ribonucleoprotein) に対する抗体を産生する。
 - ◆ 自己抗体は自己の細胞だけではなく時には第 3 者の細胞に結合し、補体存在下で細胞障害を引き起こすので、抗体スクリーニング、クロスマッチで検出される。
- 自己抗体の不活化はクロスマッチを厳密に行ううえで重要である。

M. DTT 処理 DTT treatment

【目的】

- DTT (Dithiothreitol) は S-S 結合を切断することにより IgM 抗体を不活化するスフヒドリル基(-SH 基)化合物である。
- IgG 抗体は IgM ほど S-S 結合が不安定ではないので不活化されないが、若干の影響はある。

【試料】

- 抗凝固剤なしで採血した末梢静脈血を用いる。
 - ◆ 溶血、或いは凝固していない試料は用いてはならない。
 - ◆ 試料は室温で 48 時間、4℃で 1 週間保存できるが、凍結してはならない。
 - ◆ 血清分離後は-70℃に保存する。

【試薬】

DL-Dithiothreitol(Cleland's reagent. DL-DTT)

- 13) 1M stock solution : DTT 1.543g を PBS(pH 7.4) 10ml に溶解する。
 14) 0.05M DTT working solution : stock solution 1ml を PBS 19ml で希釈する(-70°Cで1年間有効)。

【機器、備品】

- 37°C heat block. incubator. 或いは water bath

【精度管理】

- 希釈コントロール : DTT 反応が血清希釈によるものでないことを、血清 90 μl + PBS 10 μl で確認する。
- 陽性コントロール(IgG): IgG、抗補体活性に影響しないことを、高 PRA IgG 血清を DTT 未処理、処理で確認する。
- IgM コントロール : DTT 活性を高 PRA IgM 血清を DTT 未処理、処理で確認する。
- 陰性コントロール : DTT に細胞障害性がないことを、PHS(プールヒト血清)を DTT 未処理、処理で確認する。

【方法】

- 1) 被検血清 90 μl に 0.05M working solution 10 μl を加える。(DTT 最終濃度は 0.005M)。
- 2) 混和して、37°C、30-45 分間反応させる。
- 3) 抗体スクリーニング或いはクロスマッチで検討する。

【結果】

DTT 未処理	DTT 処理	判定
陽性	陽性	IgG 抗体
陽性	陰性	IgM 抗体

【注釈】

- DTT 処理はトレイで直接に実施できる(血清 1 μl + 0.01M DTT 1 μl)。
- DTT が抗補体活性に影響する時は、補体に 0.002M cystine を加えるか、補体を加える前にトレイを洗浄する(X2 回)。

- DTT 処理血清は凍結融解ができる。
- PBS で調整した DTT は 4℃ で 14 日以上保存した時は還元作用は低下すが、20℃ 保存なら還元作用は低下しない。
- ELISA, FCXM には一般的に DTT 処理血清を用いない。

【方法の限界】

- (DTT 不活化は骨髄移植レシピエントには適応されない(血小板を標的とする場合が多いので)。
- DTT は抗補体活性作用があるので注意が必要である。

N. 熱非働化 Heat inactivation

【目的】

- 従来、IgM 抗体を不活化させるのに血清を熱処理する方法が行われてきた。
- 熱処理は熱感受性蛋白を変性させて非働化するので、IgM 抗体を不活化させる場合は DTT 処理よりも効率が悪い。

【試料】

- DTT 処理で記載したのと同じ血清

【試薬】

- 特になし

【機器、備品】

- heat block. 或いは water bath

【精度管理】

- 陽性コントロール(IgG) : 熱処理が IgG 抗体と補体活性に影響しないことを、高 PRA IgG 血清を未処理、熱処理で確認する。
- IgM コントロール : 高 PRA IgM 血清を未処理、熱処理で確認する。
- 陰性コントロール : 熱処理が細胞障害性に影響しないことを、PHS(プールヒト血清)を未処理、熱処理で確認する。

【方法】

- 1) 被検血清を microcentrifuge tube に移す。
- 2) 63°C の heat block で 13 分放置する。
- 3) 遠心する(15.000rpm. 1 分)。
- 4) 上清を熱不活化とラベルした新しい tube に移す。
- 5) 保冷庫、或いは-70°C で保存する。

【結果】

未処理	未処理	判定
陽性	陽性	IgG 抗体
陽性	陰性	IgM 抗体

【注釈】

- 血清により熱処理でゲル化することがあるので、その時は血清に 2% Na azide-生食を 1 滴加えて熱処理を行う(12 μ l / 血清 200 μ l)。
- 血清を血小板で吸収する時は吸収後に熱処理を行う。

【方法の限界】

- 熱処理は非特異的で、IgM 抗体だけではなく熱感受性蛋白を非働化する。
- 熱処理は骨髄移植レシピエントには適応されない(血小板を標的細胞とする場合が多いので)。

【参考文献】

- 1) AB. Hahn. ASHI Laboratory Manual .4th edition. vol. 1. I-B-

(13) Pronase treatment of cells for use in FCXM⁽¹⁾

【目的】

- Pronase は細胞膜に取り込まれた免疫グロブリン、リンパ球細胞膜の Fc レセプター、CD20 を除去する蛋白分解酵素である。
- Pronase 前処理したリンパ球で FCXM を行うと HLA 抗体の特異性と検出感度が高くなることが報告されている⁽²⁾。
- Pronase 処理を行うことにより、脱感作療法で用いる抗 CD20 抗体による偽陽性反応を防ぐことができる⁽³⁾。

【試料】

- 全血、リンパ節、脾臓から比重遠心で分離した単核球浮遊液(血清無添加の PBS. RPMI)。
- <80% viability. 過剰の単球、顆粒球、赤血球、血小板の混入した試料は適応外である。

【試薬】

- Pronase solution : 1mg/ml Pronase in RPMI1640
- RPMI 1640 或いは PBS.X1. pH7.2-7.6
- Pronase : Protease Streptomyces griеus Type XIV(4 units/ml)
- 10%FBS/RPMI

【精度管理】

- 標準試薬、設備 QC に準じて行うべきである。

【方法】

- 1) 15ml polypropylene 遠心チューブに $5\text{-}20 \times 10^6$ リンパ球を移し、遠心後 (800G. 8分)、上清を取り除く。
- 2) Pronase solution(1mg/ml) 1ml を加える。
- 3) 37°C. 30分反応させる。
- 4) 反応終了後直ちに cold 10%FBS/RPMI を加えて酵素反応を停止させ、遠心する(800G. 8分)。
- 5) 上清を取り除き、4)を2回繰り返す。
- 6) Pronase 処理の効果は CD19-FITC. CD20-PE で染色して確認する。

【結果】

- CD19-FITC 陽性、CD20-PE 陰性であれば、CD20 は除去されたと考える。

【注釈】

- リンパ球の細胞表面抗原は再産生されるので、0.1% azide を含む cold buff で保存するべきである。

【トラブル解決】

- CD20 除去が不完全である時は、抗 CD20 抗体を $10\mu\text{l}$ 加えて、 $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ で反応させる。
- Pronase 処理リンパ球は感受性が高くなるので CDC 法には適応できない。

【一般的変法】

- 最初の洗浄の時に DNase($500\text{ Kunits}/10^7\text{ cells}$)を加える。

【参考文献】

- 1) D. Lucas. ASHI Laboratory Manual .4th edition. vol. 1. I-B-7
- 2) PI. Lobo. Transpl Int 1995 ; 8 : 472
- 3) S. Vaidya. Transplantation 2001 ; 71 : 422

(14)ICFA 法

【原理】

ICFA(immunocomplex capture fluorescence analysis)法は直径 5.6 μ m のポリスチレンビーズをプラットフォームとする Luminex テクノロジーを用いた第 3 世代のクロスマッチ検査法である。ドナー候補末梢血を溶血させ赤血球を取り除く。白血球や血小板を含む浮遊液と患者候補血清を反応させる。血清中にドナー候補と反応する HLA 抗体が存在すれば白血球や血小板上の HLA 抗原と結合する。洗浄後 Lysis 液で白血球を可溶化する。これにより HLA 抗原・HLA 抗体複合体は細胞膜から遊離する。そこに抗ヒト HLA Class I(Class II)抗体を固相化したポリスチレンビーズを加えて反応させる。洗浄後蛍光 (Phycoerythrin : PE) 標識抗ヒト IgG 抗体を二次抗体として反応させ、これを Luminex に取り込み、ビーズの蛍光強度を測定することによりドナー候補の HLA 抗原と反応する HLA 抗体の有無を同定する測定法である。

従来の LCT 法や FCXM 法の場合、ドナー候補リンパ球を用いるため HLA 抗原以外のリンパ球表面抗原と反応する抗体(非特異抗体)と HLA 抗体を区別することが難しく、これが偽陽性の原因となっていた。その点、ICFA 法はモノクローナル抗体を用いて抗原抗体複合体を捕まえるため特異性は高い。ただ、HLA 以外の minor histocompatibility antigen に対する抗体を同定することができないことに留意する必要がある。

【検体】

- 患者候補の新鮮血清あるいは凍結血清。
- ドナー候補の EDTA 加末梢血(ACD あるいはヘパリン加末梢血も可)。

【試薬】

- ビーズミックス
- 10 倍濃度溶血試薬
- 10 倍濃度洗浄液 I
- 10 倍濃度洗浄液 II
- 10 倍濃度 Lysis 液
- 10 倍濃度 PBS

- 標識抗体
- 陰性コントロール血清
(すべてキットに同梱)

【機器・器具】

- Luminex 一式
- 恒温槽
- 卓上遠心機
- 振とう機
- タイマー
- マイクロピペッター
- ボルテックス・ミキサー

【消耗品】

- ・1.5ml マイクロ遠沈管
- パスツールピペットあるいはディスポーザブルピペット
- ピペットチップ
- 96 ウェルプレート

【検査手順】(基本的に添付文書の操作手順に従う)

A. 準備

- 1) 10 倍試薬はすべて精製水で 10 倍に希釈し 2~8℃で保存し、一週間以内に使用する。
- 2) 必要な本数分の 1.5ml マイクロ遠沈管に陰性コントロール血清(NC)、患者氏名を記入する(各 2 本)。
- 3) 溶血試薬は 37℃恒温槽で加温しておく。

B. 末梢血の溶血、血清との反応と可溶化

- 1) 1.5ml マイクロ遠沈管に溶血試薬 1mL を分注し、そこに末梢血 100μL を加えよくボルテックス、恒温槽で 10 分間インキュベートする。
- 2) 2.000G で 2 分間遠心分離後上清を除去。注)ACD あるいはヘパリン加血の場合は溶血しづらいので 1)、2)の操作を繰り返す。

- 3) 洗浄液 I 500 μ L を加えよくボルテックスした後 2.000G で 2 分間遠心分離後上清を除去(2 回)。注)完全に赤血球を除去できなくても可。
- 4) 遠沈管に PBS60 μ L を分注、ボルテックス後各遠沈管に陰性コントロール血清 20 μ L、患者血清 20 μ L をそれぞれ分注。
- 5) 再度ボルテックス後 37°C恒温槽で 30 分間インキュベートする。
- 6) 各遠沈管に洗浄液 II 400 μ L を加えよくボルテックスし、2.000G で 2 分間遠心分離後上清を除去(3 回)。
- 7) 各遠沈管に Lysis 液 60 μ L を加えよくボルテックスし、室温で 10 分間振とう機上で攪拌し続ける。
- 8) 10.000G で 5 分間遠心分離し、上清を使用する。

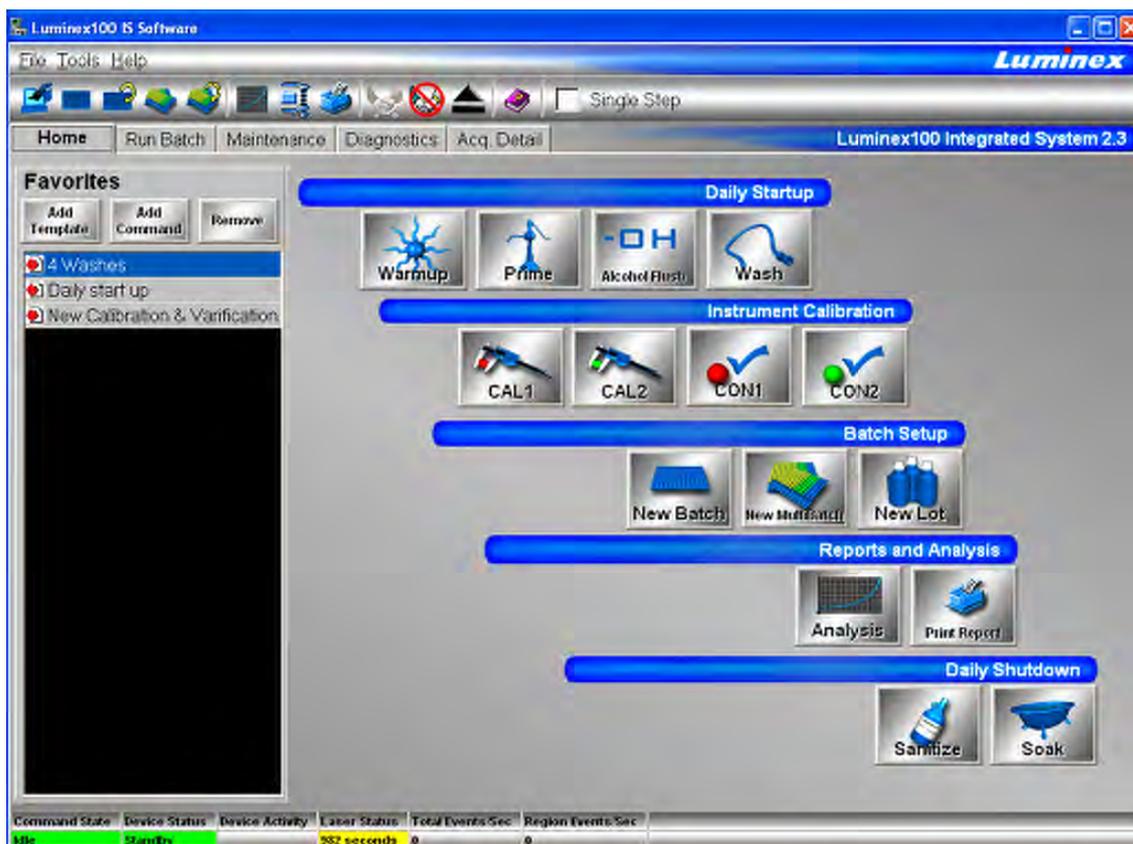
C. 蛍光ビーズおよび標識抗体との反応

- 1) ビーズミックスをしっかりとボルテックスする。
- 2) 本数分の 1.5ml マイクロ遠沈管にビーズミックス 5 μ L を分注。
- 3) C.-8)で得られた上清 25 μ L を各遠沈管に分注、遮光・室温で 20 分間振とう機上で攪拌し続ける。
- 4) 各遠沈管に洗浄液 II 400 μ L を加えよくボルテックスし、2.000G で 2 分間遠心分離後上清を除去(2 回)。注)ビーズを吸い込まないように注意。
- 5) 各遠沈管に洗浄液 II で 100 倍に希釈した標識抗体 50 μ L を加える。
- 6) 遮光・室温で 10 分間振とう機上で攪拌し続ける。
- 7) 各遠沈管に洗浄液 II 400 μ を加えよくボルテックスし、2.000G で 2 分間遠心分離後上清を除去。
- 8) 各遠沈管に洗浄液 II 75 μ を加えピペティングした後、測定用の 96 ウェルプレートに分注。

D. Luminex の起動と取り込み

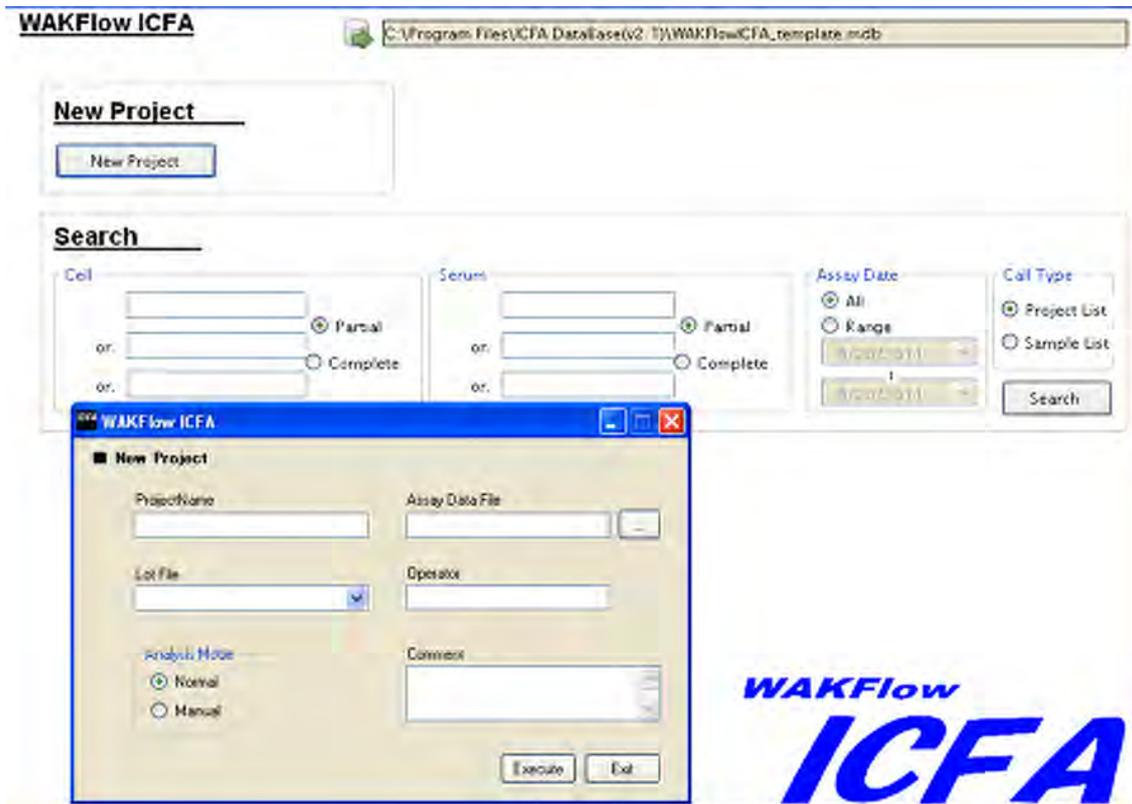
- 1) Luminex 装置及び操作用 PC の電源を入れる。アプリケーションが自動的に立ち上がり Warm up を開始する(約 30 分)。
- 2) Warm up 終了後 Daily Startup の Prime をクリック、自動的に回路内をシース液が循環する(2 回)。
- 3) Reservoir box を消毒用アルコールで満たし、Alcohol Flush をクリック。
- 4) Reservoir box を Sheath Fluid で満たし、Wash をクリック(2 回)。

- 5) 必要に応じ New calibration & Varification を行う。
- 6) 反応液を分注した 96 ウェルプレートに XY Stage にセット。
- 7) Batch Setup の New Batch をクリック、開いた window から使用した試薬と同じロット番号の Template を選択、さらに開いた window 上に必要項目を入力、Finish をクリック。
- 8) Start をクリック、取り込み終了後 Wash をクリック(4回)。



【結果と解析】

- 1) デスクトップの My Computer をクリック、C ドライブから My Batches フォルダ、さらに Output フォルダを開き新たに作られた CSV ファイルをデスクトップ上の ICFA DB ショートカットフォルダに移す。
- 2) デスクトップ上の ICFA アイコンをダブルクリック。
- 3) New Project をクリックし、必要項目を入力する。
- 4) Execute をクリックすると解析結果が表示される。Index 欄で 2.0 以上が陽性と判定される。



【留意点】

- 各ステップ毎に充分ボルテックスして、細胞と血清、あるいはビーズ、抗体などが適切に混和されるようにする必要がある。
- 結果は **Index** 計算式により自動的に計算、表示される。Class I については抗原量も豊富であることからほとんど問題になることはないが、Class II に関しては B 細胞が少ないと (Class II 抗原量が少ない場合) 偽陰性となる可能性があるため、ドナー候補の白血球数に注意する必要があり、特に白血球減少を来している場合には結果を慎重に判断すべきである。

【参考文献】

- 1) Riethmüller S. Ferrari-Lacraz S. Müller MK. *et al.* Donor-specific antibody levels and three generations of crossmatches to predict antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2010; 90: 160-167.
- 2) Caro-Oleas JL. González-Escribano MF. Toro-Laamas S. *et al.* Donor-specific antibody detection: comparison of single antigen assay and Luminex crossmatches. *Tissue Antigens* 2010; 76: 398-403.

【別紙資料】

No.2 ICFA 法

3. HLA 抗体検査

(1) FlowPRA 法

【原理】

FlowPRA 法は HLA 抗原を固相化したラテックスビーズに患者血清を反応させ、さらに蛍光(fluorescein isothiocyanate : FITC)標識抗ヒト抗体を二次抗体として反応させ、これをフローサイトメトリーに取り込み、ビーズの蛍光強度を測定することにより HLA 抗体の有無を同定する測定法である。すなわち、ビーズと患者血清を反応させると患者血清中に存在する、ビーズ上の HLA 抗原と反応する HLA 抗体が抗原抗体反応により結合し、それ以外の血清に含まれる抗体は洗浄により除去される。そこに FITC 標識抗ヒト抗体を反応させるとビーズ上の HLA 抗原と結合した HLA 抗体のみに結合するため FITC の蛍光強度の変化が抗体の有無や抗体量の多寡をある程度反映することになる。

測定キットには 1.Screening、2.Specific と 3.Single Antigen の 3 種類がある。

1.は培養細胞株から抽出された HLA 抗原(Class I は A、B、C 抗原、Class II は DR、DQ、DP 抗原)が固相化されたビーズ 30 種類をミックスしたもので、ある。ロットによって若干の違いはあるものの日本人が保有している抗原は概ね網羅されているもののすべてではないということに留意する必要がある。

Class I ビーズ、コントロールビーズ、Class II ビーズの順に Phycoerythrin(PE) 蛍光が強くなるため 2 color dot plot で 3 つのビーズを区分することが可能であ

る。HLA 抗体陰性の場合には 30 種類のビーズはほぼ同じ FITC 蛍光を示すためシングルピークのヒストグラムとなるが HLA 抗体陽性の場合にはいずれかのビーズで FITC 蛍光が増強するためマルチプルピークのヒストグラムとなる。ただしどのビーズが反応したのかはわからない。そのため抗体の有無を測定するのに特化されたキットと言える。2.は PE 蛍光の異なる 8 つ(あるいは 11)のビーズに 1.と同様培養細胞株から抽出された HLA 抗原が固相化されておりどのビーズが反応したのか解析可能である。ただ、3 種類の HLA 抗原のうちどの抗原と反応したのかわからないため、CDC-PRA 法と同様にセログラフで解析したとしても抗体の特異性を明確に同定するのは難しい。そのため抗体検査に使用するには中途半端なキットであり、本稿では試薬の種類の記事のみにとどめる。3.は遺伝子導入により単一の HLA 抗原を発現させた培養細胞株から得られた HLA 抗原を 2.と同様のビーズに固相化している。A 抗原 21、B 抗原 43、C 抗原 16、DR 抗原 24、DQ 抗原 7、DP 抗原 8 に対応している。そのため HLA 抗体の特異性を同定することが可能である。ただし、(1)すべての抗原を網羅してはいない(2)日本人の抗原頻度に合わせているわけではない、ことに留意する必要があるのは 1.と同様である。

【検体】

新鮮血清あるいは凍結血清。ただし血漿でも若干バックグラウンドが高くなるものの概ね問題ないように考えられる(私見)。ASHI マニュアルでは夾雑物を除くために事前に高速遠心処理するとされているが、日本国内の HLA 検査室で 100.000rpm 以上の超高速遠心機は一般的ではない。一応、マイナス 80°C以下に凍結し再解凍して 15.000rpm10 分以上の冷却遠心を推奨する。ただし、これまで検索した限り検体の種類や処理による検査結果の違いについて詳細に検討した報告はない。

【試薬】

1) Screening

- FlowPRA Class I and Class II Screening Tests (One Lambda: cat#:FL12-60)
あるいは
- [FlowPRA Class I Screening Test (One Lambda : cat#:FL1-30)]
- [FlowPRA Class II Screening Test (One Lambda : cat#:FL2-30)]
- FlowPRA Control Beads (One Lambda : cat#:FLNCBD)

2) Specific

- FlowPRA Specific Class I Antibody Detection Test-32 antigen panel
(One Lambda : cat#:FL1SP)

注)44 antigen panel もある(One Lambda : cat#:FL1SP44)

- FlowPRA Specific Class II Antibody Detection Test-32 antigen panel
(One Lambda : cat#:FL2SP)

3) Single Antigen

- FlowPRA Class I Single Antigen Antibody Detection Test
(One Lambda : cat#:FL1HD)

- FlowPRA Class II Single Antigen Antibody Detection Test
(One Lambda : cat#:FL2HD)注)

別売りで FlowPRA Single Antigen HLA Class I Supplement Group1～10 (One Lambda : cat#:FL1HD01～10)と FlowPRA Single Antigen HLA Class II Supplement Group1～5 (One Lambda : cat#:FL2HD01～5)がある。

【共通試薬】

- Negative Control Serum (One Lambda : cat#:FLNC)
- Class I Positive Control Serum (One Lambda : cat#:FL1-PC)
- Class II Positive Control Serum (One Lambda : cat#:FL2-PC)
- Wash Buffer ×10 (キットに同梱)
蒸留水で10倍に希釈して使用(用時調製)
- FITC conjugated goat. anti-human IgG [F(ab)'₂ Fc specific] (キットに同梱) IgM 抗体を測定する場合にはサードパーティー製の FITC 標識抗体を使用する。

【機器】

- フローサイトメーター一式
- 冷却遠心機
- 卓上遠心機
- 振とう機
- タイマー
- マイクロピペッター

- ボルテックス・ミキサー

【消耗品】

- 1.5ml マイクロ遠沈管あるいは 96 ウェル U 字プレート
- パスツールピペットあるいはディスポーザブルピペット
- ピペットチップ
- ファルコンチューブ(75×12)

【検査】

マイクロ遠沈管の場合

96 ウェルプレートを用いる場合も同様の操作を行うが、wash buffer の量が少ないため洗浄回数を多めにする必要がある。

- 試薬と検体の反応
 - 1) 被験血清(凍結している場合は解凍)をよく混和し被験者名を記したマイクロ遠沈管に必要量分注(100 μ l 以上を推奨)し、15,000rpm10 分以上冷却遠心する。
 - 2) 陰性コントロール、陽性コントロール、被検検体用のマイクロ遠沈管を用意し NC、PC、氏名などを書く。
 - 3) 試薬チューブをビーズが完全に懸濁するまでボルテックス・ミキサーでよく混ぜる。
 - 4) 最初にコントロールビーズ 1 μ l、次に Class I、Class II ビーズ各 5 μ l を分注する(Class I、Class II 両方の抗体を測定する場合)。Single Antigen の場合は試薬 5 μ l を分注。
 - 5) コントロール血清あるいは患者血清 20 μ l を分注。陽性コントロールは Class I、Class II 各 10 μ l 分注。Single Antigen の場合は各クラスの陽性コントロール 10 μ l を分注。
 - 6) 各チューブをボルテックスし、室温・暗所で振とう機上にて 30 分間インキュベーション。
 - 7) 1ml 以上の wash buffer を加えボルテックス、9,000G 2 分間遠心。上清をパスツールピペットあるいはディスポーザブルピペットで除去(ビーズを吸ってしまわないように注意)。メーカー及びベンダーはここでドラ

イ・ボルテックスを推奨している。

- 8) 上記操作を二度繰り返す。
- 9) 抗ヒト FITC 標識抗体(IgG か IgM)を各ウェルに分注。キット同梱の抗体の場合は 1 μ l あるいは希釈に応じた量(5倍希釈なら 5 μ l、10倍希釈なら 10 μ l)、その他の抗体の場合は希釈とタイターに応じた量。
- 10) 各チューブをボルテックスし、室温・暗所で振とう機上にて 30 分間インキュベーション。
- 11) 1ml 以上の wash buffer を加えボルテックス、9.000G 2 分間遠心。上清をパスツールピペットあるいはディスポーザブルピペットで除去(ビーズを吸ってしまわないように注意)。メーカー及びベンダーはここでドライ・ボルテックスを推奨している。
- 12) 上記操作を繰り返す。
- 13) フローサイトメーターの各メーカーが推奨するメディウム 350~500 μ l 分注したファルコンチューブをマイクロ遠沈管の本数分用意し、反応終了後のビーズ浮遊液を各チューブに移す。

- フローサイトメーターの準備と検体の取り込み

FACSCalibur、FACSCantoII、EPICS、FC500 については巻末の参考資料参照。それ以外の機器については各メーカーのプロトコールに従う。

【結果と解析】

1)Screening

基本的に複数のピークを持つヒストグラムの場合は HLA 抗体陽性で、単一ピークの場合は陰性である。単一ピークのまま右側にシフトしている場合は非特異反応の可能性が高いが、時にわずかにシフトするビーズがマスクされている場合もあるので、**Single Antigen** あるいは **LABScreen Single Antigen** で特異性を確認することを推奨する。

Screening ビーズは 30 種類のビーズのミックスであり、個々のビーズが描くヒストグラムは理論的には標準偏差の小さな正規分布曲線である。抗体陰性であればこの正規分布曲線の中央値も正規分布的な分散を示すはずであるからそれらが合成されると図 8 のようなヒストグラムとなる。

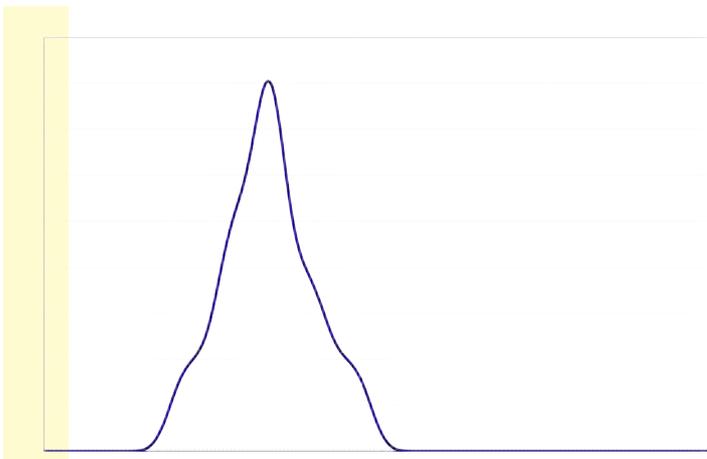
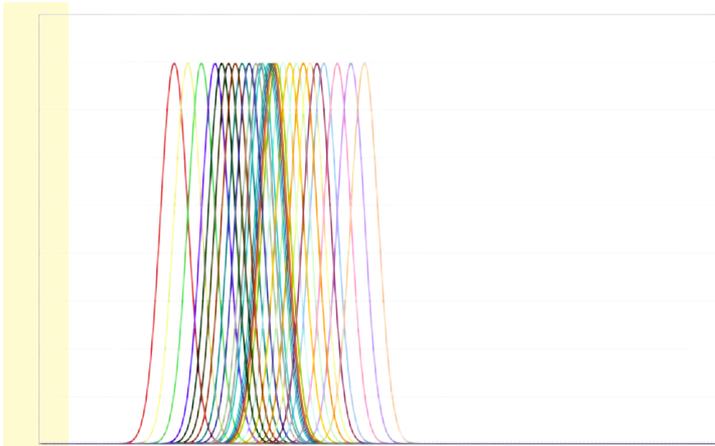
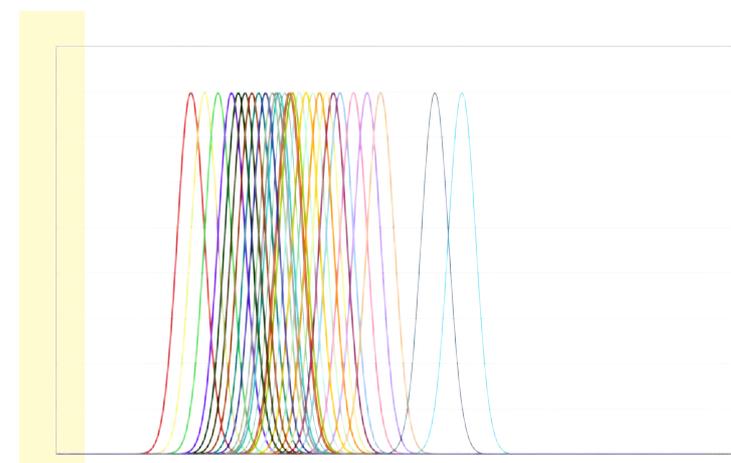


図 8)左が個々のビーズが描く曲線で右がそれを合成したもの

これは Class I ビーズの場合であるが、Class II ビーズの場合は HLA 抗原の種類や抗原性の違いが少ないため、よりばらつきの小さい正規分布に近いヒストグラムとなる。30 種類のビーズの内一つでも正規分布から外れたばらつきを示すと図 9 のような複数のピークを示すことになる。



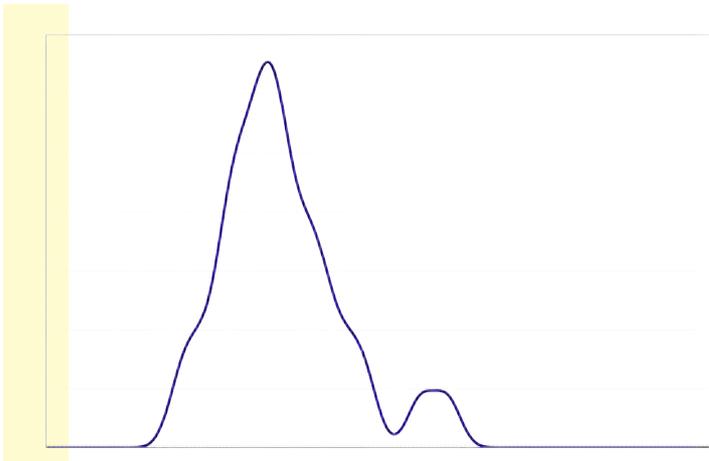


図 9)左で緑と青の正規分布曲線が右にずれ、右にピークを作る

【留意点】

陰性コントロールと比較してヒストグラムが右方向(FITC 蛍光強度が強い方向)にシフトしているということは、何らかの抗体がビーズ上の HLA 抗原に結合しそれと FITC 標識抗ヒト IgG 抗体が結合したことを示している。そのほとんどは HLA 抗体と考えられるが、FITC 標識抗ヒト IgG 抗体で区別できるわけではないということに留意すべきである。本来フローサイトメーターはモノクローナル抗体を用いて特定の抗原を同定するものであり、特定の抗原に結合する抗体が特異的抗体であるとすることはできない。いわば必要条件と十分条件の違いである。測定対象となる患者血清中には様々な抗体が存在しておりそのレパートリーは個々の患者によっても異なる。したがって結果を判定するには患者自身の感作歴なども考慮した総合的な判断が求められる。

特に男性患者で輸血歴も移植歴もない場合、ごく一部の抗原にのみ反応する場合は natural antibody の可能性も考慮に入れる必要がある。

【参考資料】

- 1) FlowPRA SCREENIG TEST Product Insert (One Lambda)
別紙資料 No. 3 FlowPRA (FlowPRA PI) 参照
- 2) FlowPRA SCREENIG TEST 添付文書(ベリタス) [上記文書の日本語訳]
別添資料 No. 4 FlowPRA (FLOWPRA SCREENING TEST 添付) 参照
- 3) FCM 入門(ベックマン・コールター)
別添資料 No. 5 FlowPRA (FCM 入門)、No. 6 FlowPRA (FlowPRA ユ

ーザーのための FCM 機器講座) 参照

4) FlowPRA サンプル測定のための FCM 設定(ベックマン・コールター)
別添資料 No. 7 lowPRA (FlowPRA サンプル測定の為の FCM 設定) 参照

5) FlowPRA プロトコール Calibur(ベクトン・ディッキンソン)
別添資料 No. 8 FlowPRA (FlowPRA フ・ロトコール Calibur) 参照

6) FlowPRA FACSCantoII 測定(ベクトン・ディッキンソン)
別添資料 No. 9 FlowPRA (FlowPRA FACSCantoII 測定) 参照

7) 抗原コーティングビーズを用いたフローサイトメトリーによる抗体検出
(ASHI) [ASHI laboratory Manual 4th edition Volume II の VI. B. 2. 1
章の日本語訳(文責：佐藤 壯)]

別添資料 No. 10 FlowPRA (ASHI4E VI.B.2.1) 参照

(2) Luminex 法

【目的】

- HLA 抗体のスクリーニング・特異性同定 virtual cross match に適応。

【測定原理】

- Luminex beads とは強度がわずかに異なる 2 種の蛍光をビーズに付着し、この 2 種の蛍光の違いを利用し、番号付けされた(一般的には 100 種類の番号化されたビーズが使用可能である)ビーズであり、suspension array technology を用いることを可能にした。このビーズに HLA 分子が付着されている(最大 100 種類の HLA 分子または抗原群が識別可能となる)。多型性が高い HLA を識別するには有利なビーズである。ビーズと検体(血清または血漿)を混合し反応させ洗浄後、標識抗ヒト Ig と反応させる。検体内に HLA 抗体が存在する場合、抗原に結合した抗体を標識 2 次抗体で検出するバインディングアッセイである。2 次抗体の種類を変えることにより、免疫グロブリンのクラス(アイソタイプ)やサブクラス別に抗体の検出が可能である。

〔good point〕

◆ 検査精度について

1回の検査で 100 回検査を繰り返した結果の総合データとしての検査結果。試薬にはその種類により 100 種のビーズがそれぞれ多数(1 種類のビーズが 100 個以上)混合されている。測定器(Luminex100 または 200)は小型のフローメトリ解析装置で、1 検体あたり、全種類のビーズをそれぞれ最低 100 個測定するまで計測を続けるように設定できる。すなわち 1 個のビーズの全表面に付着している多数の HLA と抗体(検体)が反応した結果を 1 回の測定すると、同じ検体について 100 回の抗原抗体反応を繰り返した総合評価としての結果を得ることができる。これが最大の利点である。

◆ 操作性について

抗原抗体反応→洗浄→標識 2 次抗体と反応→洗浄→測定》、単純な操作であり、すべての試薬がキットに付属され簡便である。

◆ データ解析について

測定器から出される生データ(CSV file)はビーズのカウント数、蛍光値の中央値、trimmed mean、trimmed count、平均値、測定時の機械の温度記録などあらゆるデータが含まれ、情報量が多い。

[weak point)

◆ 検査精度について

従来の検査法(LCT. AHG-LCT. LAT etc)に比べ検出感度が格段に高く、各種の臨床検体を用いたデータの蓄積が現時点では少ないため、臨床的意義を示すカットオフ値の設定がまだできていない。今後の課題である。

◆ 操作性について

ビーズ試薬が微量であるため、ピペット操作や攪拌・洗浄操作に精度が要求される(どのような臨床検査においても共通のことであるが)。

◆ データ解析について

提供された結果解析ソフトから出される結果をうのみにすると、誤判定をする可能性がある。検査精度のところでも述べたとおり、非常に感度が高い検査法であるため、解析ソフトに使用されている解析法の原理をよく理解し、陽性と陰性のカットオフ値が定められている場合は、その決定方法を熟知した上で結果を判定することが必要である。

【検体】

- 血清、血漿

【注意点】

- 抗体のモニタリングのように、同一の患者について繰り返し検査をおこなう可能性がある場合、血清で検査する場合は常に血清で、血漿で検査する場合は常に血漿をもちいること。血漿検体が血清検体より強い反応(MFI : 蛍光強度)を示す検体がある。血清に EDTA(最終濃度 50mM)添加により血漿と同様の MFI が得られる。
- 検体によっては NC beads の MFI が非常に高い場合や、PC beads(ビーズ

表面にヒト IgG がコートされている)の MFI が低い場合がある。Adsorb Out 処理をおこなうことにより、低い background で PC beads の MFI を高くし、めりはりのある反応結果が得られる。通常、NC beads の MFI 値は 100 以下、PC beads の MFI 値は 10000 以上である。1 回の Adsorb out 処理でも不十分な場合は 2 回繰り返すことにより効果が得られる。

(Adsorb out の使用上の注意)

基本的に取り扱い説明書にしたがって行うこと。特別な注意点は adsorb out と検体を混合するとき、高速で混合することは避け、ゆっくりとビーズと検体が混ざり合う速度を選択することがキーポイントである。初めて使用する場合、緩やかな回転で検体とビーズがゆっくりと混ざり合うことを確認する。混合時に泡を作らないようにすることも重要なポイントである。

〔Adsorb out 手順早見表〕

AdsorbOut手順			
AO処理準備	血清(血漿)	23ul	0.5ml tube 内で行う
	AdsorbOut beads	2ul	使用前に必ずvortex
インキュベート	室温	1h	要 回転混和・アワを立てない
遠心	15000rpm	30min	低温(4℃)
上清のみ移し変え 約 23ul	新 0.5ml tube		AObeadsを抜き取らない
各種検査(検査前遠心)へ			

攪拌機の例



【コントロール検体】

●標準血清

Luminex で検査した結果が既知(CSV file;この検査法に習熟した Reference Lab または試薬メーカーにより実施された)の HLA 抗体陽性血清。(説明)標準

血清は試薬に添付されていることが望ましく、自己施設の精度管理(検査手技と測定器の精度)だけでなく、同一試薬を用いる施設間精度管理にも役立てることができる。試薬メーカーである One Lambda では必要に応じて、試薬と共に標準血清の販売も可能であることが確認されている。

(使用方法)

A. Luminex による HLA 抗体検査を始めて導入する施設

- 1) 標準血清と Negative control serum を用い、試薬の取り扱い説明書に従い検査を実施する。
- 2) 既存の CSV file (エクセルファイル)から Trimmed count と Trimmed mean(数字は整数にして)をそれぞれのシートにコピーする。
- 3) ビーズ番号に相当する HLA アリル名を各ビーズ番号の上のカラムに記入する(カラムがなければ挿入すること)
- 4) 既存のデータの下に自施設のデータを CSV ファイルよりコピーする。

● 評価方法

- ◆ ビーズカウント：かならず 100 以上のカウントが確保されていることを確認する。低いカウントでは信頼性に問題があり、疑陽性反応を示す場合が多い。また検体によっては陽性を示すビーズのカウントが低くなる場合がある。ビーズが凝集し、従来の領域からずれるため、本来のカウントが低下していることが原因の場合がある。検体を希釈(x2)するか Adsorb out を実施することで、十分なカウント数と蛍光値(MFI)が得られる。カウントの確保は蛍光値を評価する上で重要なポイントである。
- ◆ Trimmed mean (median で蛍光値を評価したい場合は median を用いる)：すべての蛍光値がほぼ同程度(差<1000)であることを確認する。特に NC beads は 100 以下で PC beads は 10000 以上の値が得られる。自施設のデータがこの条件に満たない場合、例えば陽性と判定される蛍光値が既存のデータと比較し、1000 以上低い場合は 2 次抗体の使用濃度や攪拌方法などを再確認し、測定器の Calibration も再度実施す

る。全体的にバック反応が高い場合(陰性反応が3桁を示す)は洗浄操作が不十分である場合があるので、洗浄操作の確認(洗浄回数を増やした場合と比較する)すること。この操作を繰り返し、自施設の最適な実験条件の設定と技術の習熟をめざす。

B. Luminex 法で日常的に HLA 抗体検査を実施している施設

- 1) 標準血清を毎回の検査時に検体と共に検査する。
- 2) 上記の初心者用で説明したデータファイルを作成し、毎回の検査の精度管理や月ごと、または年間の精度に利用する。
- 3) 問題点が発生し、自己評価法で解決できない場合は試薬メーカーや他の経験豊かな施設に問い合わせ、できる限り早期に解決すること。

● Negative control serum

アロ免疫の経験のない男性も HLA 抗体が検出されることがあるので、自施設で準備するのは難しい場合があるが、試薬メーカーから販売されているものは、検定済みであり、検査手技と測定機器管理用検体としても用いられる。同一ロットを用いる限り、日差変動は二桁以内に収まる。3桁の変動が検出される場合は検査手技に要注意である。

【必要物品】(準備する試薬、消耗品、機器など)

検査に必要な物品を写真で示す。



シリンジ
(ニードル)

反応トレー用シール・反応トレー・測定用トレー・洗浄 Buffer・キット試薬・Luminex 測定機
反应用トレーと測定用トレーの両方の機能を有したトレーも市販されている (価格と全容量の違いがある)。



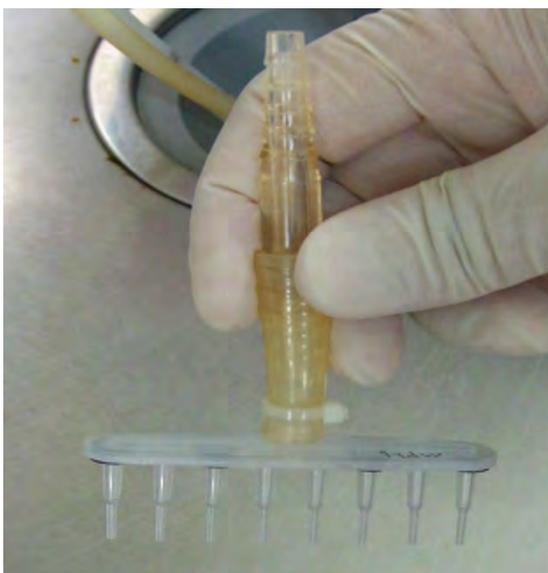
試薬は蛍光標識されているので、遮光して保存、上記 (左) のような Box を作成すると便利である。
右は検査で使用する試薬の一覧であるが、使用濃度にした 2 次抗体用に遮光したチューブを用意する。



- プチ遠心機は試薬を攪拌後、軽遠心で管壁について試薬をおとすために使用する。
- ボルテックスミキサーはビーズ試薬の攪拌や反応トレ



- シェーカーはビーズと検体のインキュベーションや2次抗体とのインキュベーションに用いる。



- ビーズ洗浄時の洗浄液の吸引に用いる。操作方法は後述する。フリッキング法（トレーを手でフリックして、洗浄液を除去する）より、容易でビーズロスの可能性が無く、初心者向きの方法である。



5種のピペットが必要

1. 1~10 μ l
2. 10~100 μ l
3. 20~200 μ l
4. 8連 (20~200 μ l)
5. 100~1000 μ l



● 反応トレーの遠心機

高速で遠心できるように、下記のようなしっかりした遠心用ラックが必要。



【検査手順】

市販キットのプロトコールに従っておこなう。開発されて間もない方法であるため、操作などに改良が加えられることが起こると思われる。追加の情報には常に敏感でいること。

- 実験準備と後始末の便利メモを下記に示す。
- Luminex のシリンジ(ニードル)はつまり易いので特に洗浄に注意。

Luminex実験準備と後始末

シリンジ洗浄	
シリンジをはずす	
蒸留水のみで『DEGAS』	オートストップ
シリンジを入れて『スタート』	20min 25.0°C

予備のシリンジは1本は確保すること。
毎日Luminexを使用する場合は1週間に一度、たまに使用する場合は使用前にシリンジを洗浄すること。

シリンジ高さ調節	
1: Options	4: Test / Retract
2: SetupXY	5: [4]をスペーサーで繰り返し
3: SetupXY	[4]と[5]の説明は下記
スペーサー2枚	手で確認=『きっちり』動かない
スペーサー1枚	手で確認=『少しだけカクカク余裕』動く

Luminex実験『前』set up			
	内容	回数	使用試薬
①	Warm UP	1	-
②	Prime	1	-
③	Alkohol Flasch	1	70%エタノール
④	Back Flasch	3	シースフルー
⑤	Wash	3	シースフルー

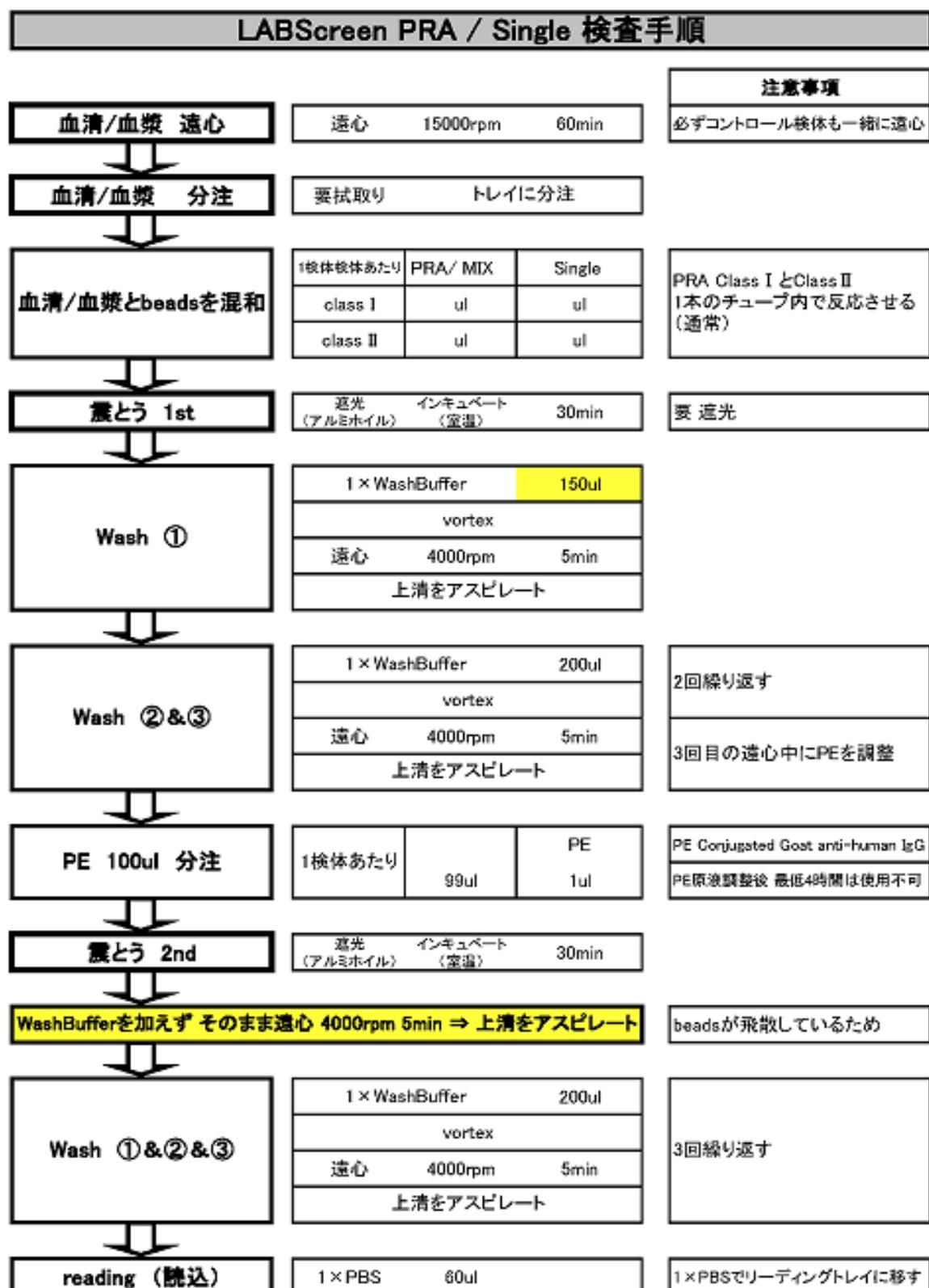
Luminex実験『後』shut down			
	内容	回数	使用試薬
①	Back Flasch	3	シースフルー
②	Wash	3	シースフルー
③	Sanitize	1	10%ピューラックス
④	Wash	3	dH ₂ O
⑤	Soak	1	dH ₂ O

- シリンジの洗浄機と方法を図で示す。



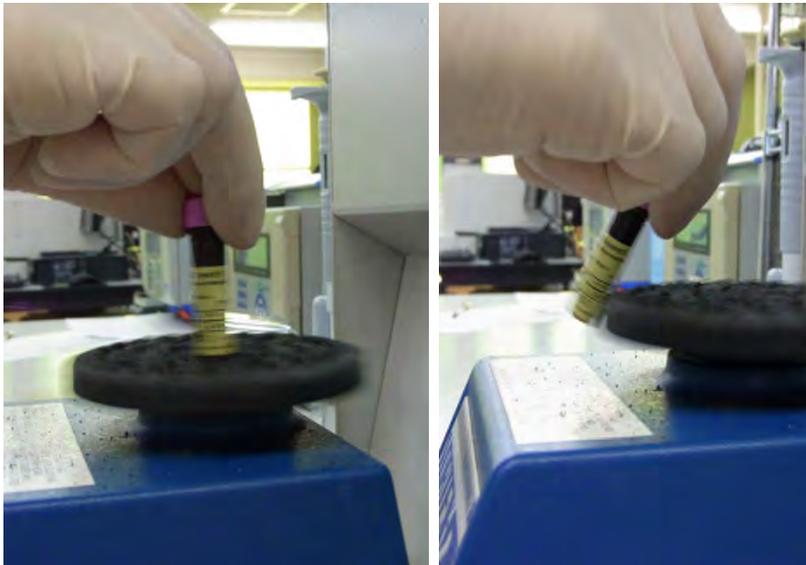
左が超音波洗浄機で、右がシリンジをセットした様子を示している。

- 検査手順早見表を示す。



- 注意を要する操作法を図で示し解説する。

- 1) ビーズ試薬の攪拌法：多種のビーズが含まれるので、できる限り均一に一定量を採取する工夫が必要である。



ビーズ試薬ボトルは垂直方向に混合するだけでなく、図のように側面からも振動を加え十分混合する。ビーズの混合には 2000rpm 以上のスピードをかける必要がある。

- 2) インキュベーション中の反応トレーの遮光方法



反応トレーをチップの空き箱をラックとして使用し、固定する。左の図のようにアルミフویلを適当な大きさに切り、包む。

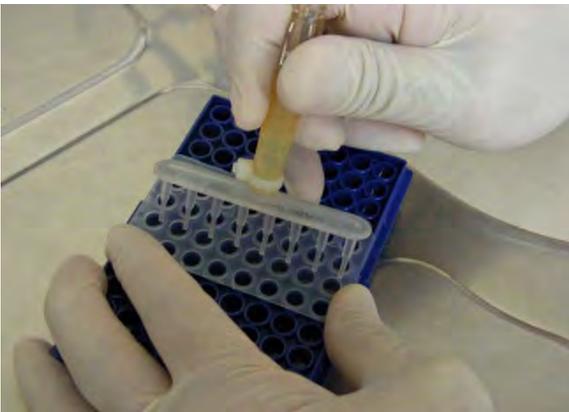


上左図が遮光済みの反応トレーである。右図のようにシェーカー上で固定し、攪拌しながら 30 分間、室温でインキュベートする。

3) アスピレーターを用いたビーズの洗浄方法



洗浄液をトレーに入れ、シールを各ウエルの輪郭がみえる程度にしっかりと貼り、左図のようにボルテックスミキサーで、洗浄液の渦巻きを確認する。その後遠心し、ビーズを底に沈殿させる。



左図が反応トレーより洗浄液を抜き取っている様子である。アスピレーターの先端のニードルの長さはトレーの底にとどかないようにセットされている。



洗浄液に色をつけ、アスピレーターを用いた吸引の前と後の状態を左図に示した。アスピレーターのニードルをトレーに完全に挿入しても、トレーの底には届かず、洗浄液が底に少し残る。残った液量だけ洗浄効果が低下する原因となることも考えられるため、洗浄回数を1回増やしている。



【市販試薬について】

A. LABScreen Mixed: 1種類のビーズに3~5種類のパネル細胞のHLAが付着されている。

このキットは血漿や血清中の HLA 抗体の有無を検出できるキットである。ただしひとつのビーズに数人分の HLA がコートされているため、弱い抗体は見逃す可能性もあるが、LCT や AHG-LCT で検出される程度の抗体は検出できる。使用する前にコートされている HLA の種類を確認し、ある程度の頻度で日本人に存在する抗原が含まれていることを確認しておくこと。日本人の高頻度抗原が含まれていない場合は、その抗原について抗体の有無は検出できないことを結果レポートに記載すること。ただしその抗原と共通エピトープを保有する抗原がキットに含まれる場合もあり、キットに含まれない抗原であっても、共通エピトープに対する抗体の有無は検出できる。検査者は HLA についての知識を習得しキットを使用することが必要である。

B. LABScreen PRA : 1種類のビーズに1種類のパネル細胞のHLA(class I と class II は別々のビーズ)が付着されている。

血清や血漿に含まれる HLA 抗体の有無を Labscreen Mix より高感度に検出できるキットである。使用する前にコートされている HLA 抗原の種類を確認し、日本人にある程度の頻度で存在する抗原が含まれていることを確認する。LABScreen PRA は LABScreen Mix に比べ検出感度も高く、抗体のスクリーニングだけでなく、特異性を推測できる場合もある。検査者は HLA についての知識を習得しキットを使用することが必要である。

C. LABScreen Single Antigen : 1種類のビーズに1種類の精製 HLA 分子が付着されている。

HLA 抗体陽性の検体について、特異性の同定ができる。高感度であり、DSA(ドナー特異的抗原)に対する反応性の有無も検査できる。ただしビーズに付着されている抗原には限りがあり、キットの持つ特性を十分利用し活用するために検査者は HLA についての知識を習得することが必須である。

市販キットにはその他の種類もあるが、現在の主なものについて記載

した。新しく、より改良され優れたキットが発売される可能性があり、検査者は試薬についての最新情報を得ることも重要である。

【結果、解析】

検査キットに解析ソフトが添付されているが、解析をする前に Luminex から出される生データ(CSV file)を確認することが重要である。CSV file はエクセルで読むことができる。このファイルには測定時の環境状態を含めたいろいろな情報が含まれている。特に各ビーズのカウント数(trimmed count)が少なくとも 100 は確保されていること、および NC bead と PC bead の MFI(trimmed mean)がそれぞれ 3 桁以下と 5 桁以上であることが確認できた検体について解析を行なう。但し NC bead と PC bead の MFI はキットの品質により異なる場合も起こりえるので、Labscreen kit を使用した場合である。例えば PC bead の表面に付着している IgG の量や 2 次抗体の検出能力の違いにより、特に PC bead の MFI の強度は変化する。

- 注意すべき点(問題点と解決方法など)

検査の各ステップに記載している。

【参考文献】

- 1) Fulton JR. McDade RL. Smith PL. et al : Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix™ system. Clinical Chemistry. 43: 1749-1756. 1997
- 2) Cesbron-Gautier A. et al. : Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities. Ann Biol Clin . 62(1): 93-8. 2004
- 3) EI-Awar N. Lee J. Terasaki PI: HLA antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods. Hum Immunol. 66(9): 989-997. 2005
- 4) EI-Awar N. Terasaki PI. Nguyen A. Sasaki N. Morales-Buenrostro LE. Saji S. Maruya E. Poli F: Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. Hum Immunol. 70(10):844-853. 2009