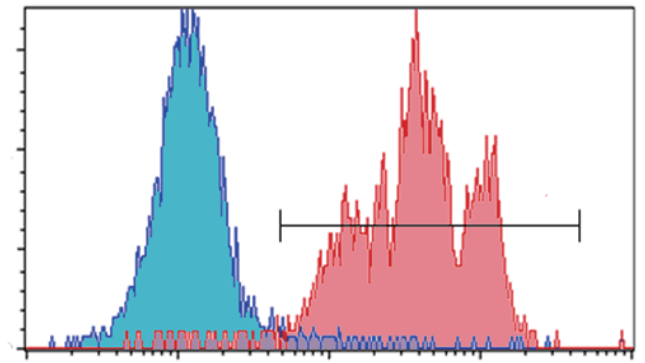
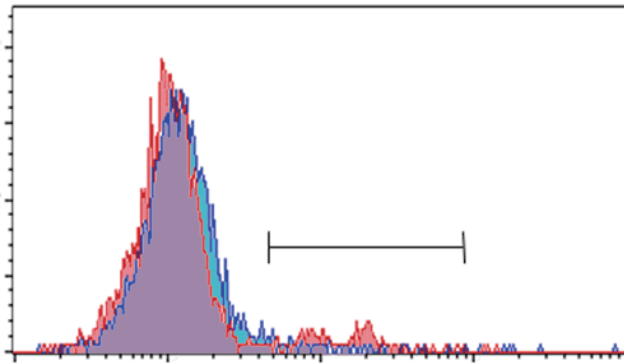


ワンラムダ社

---

# FlowPRA ユーザーマニュアル

## FlowPRA Screening Test 編

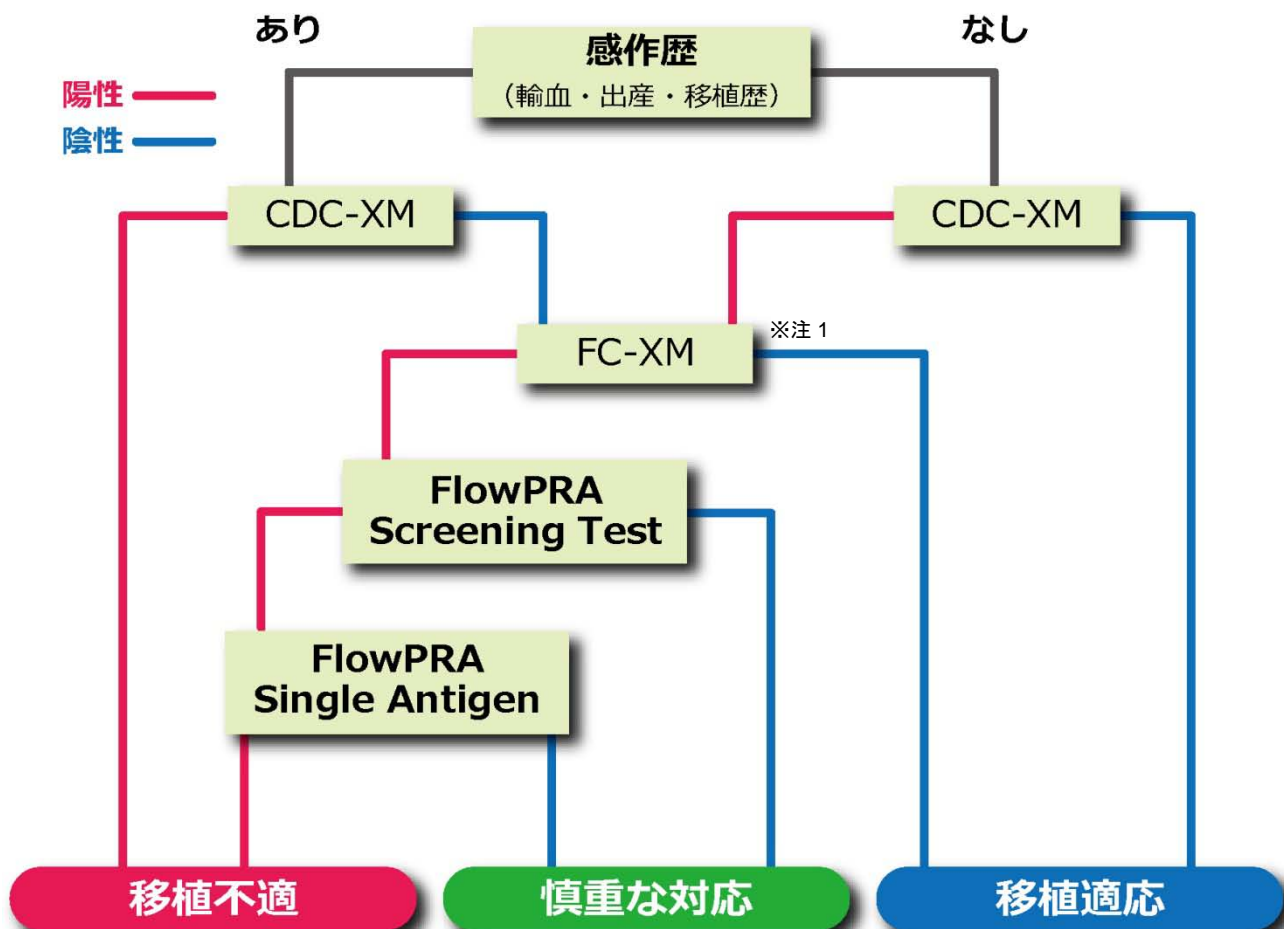




# CONTENTS

移植における FlowPRA を使用した HLA 抗体検出 フローチャート.....	2
FlowPRA 概論 .....	3
FlowPRA Screening Test.....	4
FlowPRA Specific Test .....	5
FlowPRA Single Antigen .....	6
FlowPRA Screening Test 操作.....	7
FlowPRA Screening Test のフローサイトメーター条件設定 .....	10
FlowPRA Screening Test データ例.....	14
機器設定の重要性 .....	17
FlowPRA Screening Test ケーススタディー【1】 .....	18
FlowPRA Screening Test ケーススタディー【2】 .....	19
日本組織適合性学会 QCWS 参加施設のデータ例 .....	20

## 移植における FlowPRA を使用した HLA 抗体検出 フローチャート



CDC-XM: CDC クロスマッチ

FC-XM: フロークロスマッチ

※注1 CDC-XM が陽性で FC-XM が陰性な場合、FlowPRA Screening Test で陰性であることを確認するのが望ましい

## FlowPRA 概論

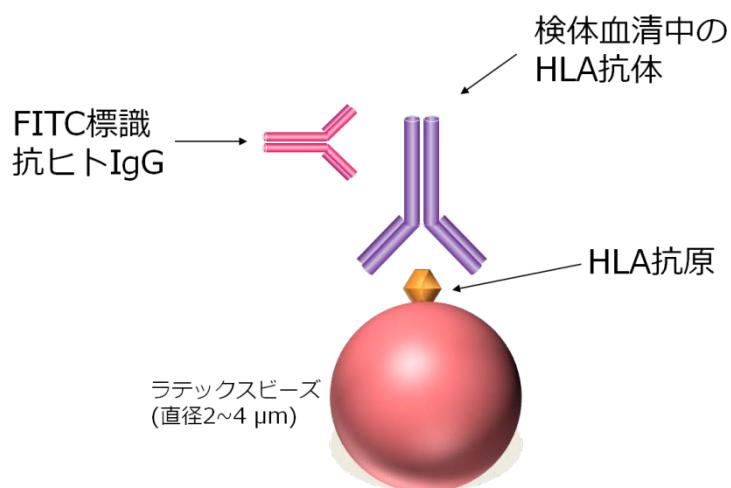
### I. FlowPRA の測定目的

FlowPRA 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 Class I および Class II 抗原に対するパネル反応性抗体 (PRA; panel reactive antibody) の検出を目的としています。

(FlowPRA は研究用試薬です。)

### II. FlowPRA ビーズ

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  $\mu\text{m}$ ) であり、FlowPRA テストは、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。



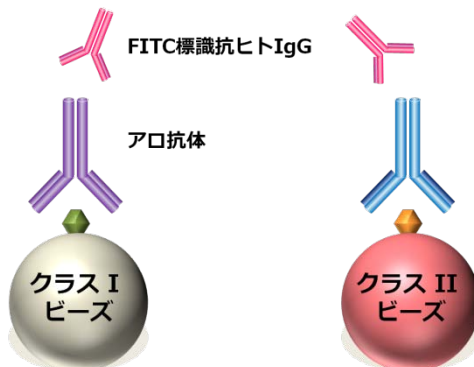
### III. FlowPRA 製品の種類

	%PRA	特異性	使用用途
FlowPRA Screening Test	○	×	HLA 抗体の有無をスクリーニング
FlowPRA Specific Test	○	△	%PRA とおおよその特異性
FlowPRA Single Antigen	×	○	HLA 抗原の特異性を決定

## FlowPRA Screening Test

### I. FlowPRA Screening ビーズと原理

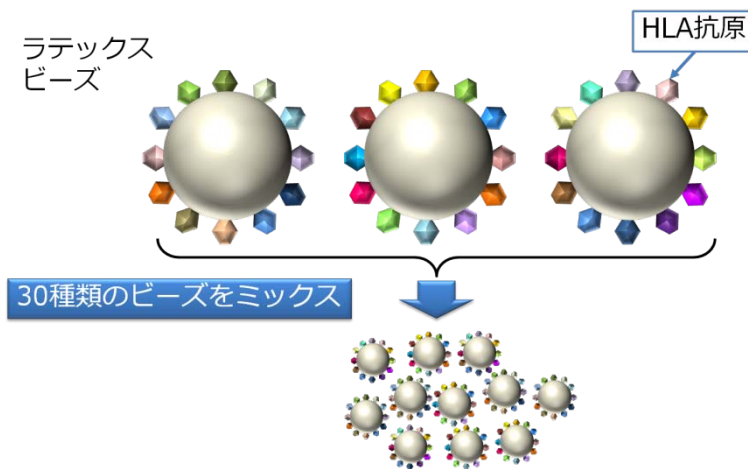
FlowPRA ビーズと血清をインキュベートした後、蛍光標識抗ヒト IgG 抗体で染色し、フローサイトメーターにより蛍光強度を測定します。Class II は、ビーズに PE が練り込まれています。



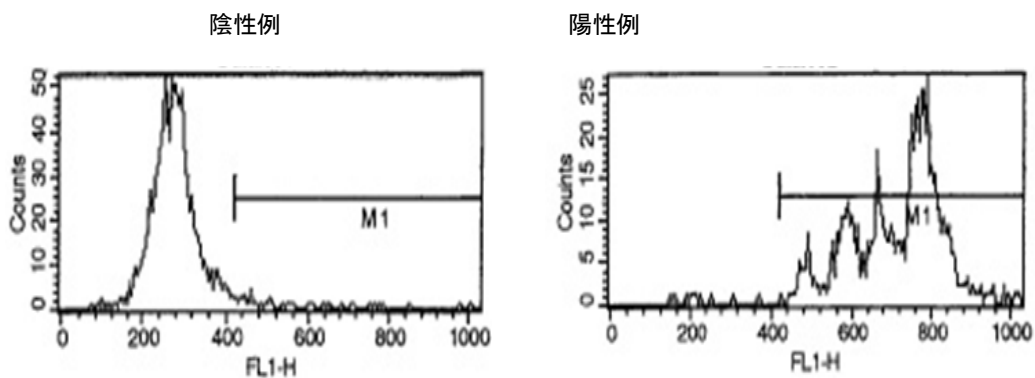
### II. FlowPRA Screening ビーズの構成 (Class I 用と Class II 用があります)

それぞれ異なる抽出 HLA 精製抗原をラテックスのビーズ上にコーティングしています。そのビーズが 30 種類混和されたもので、すべての HLA 抗原を網羅しています。

(詳細に関しては、ロットごとのワークシートをご覧ください)



### III. FlowPRA Screening Test の例

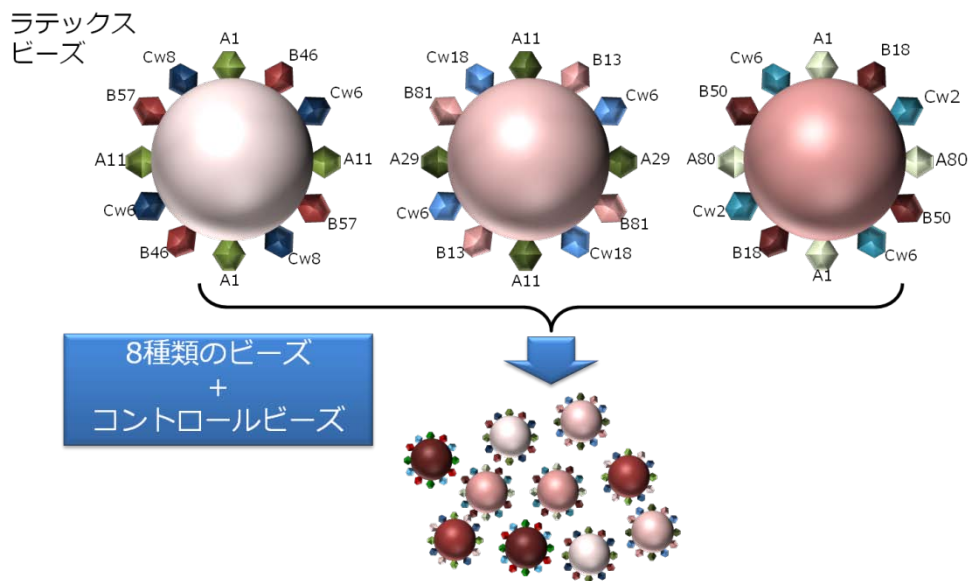


## FlowPRA Specific Test

### I. FlowPRA Specific ビーズと原理

それぞれ異なる抽出 HLA 精製抗原を PE 蛍光が異なるラテックスのビーズ上にコーティングしています。PE 蛍光でビーズの位置を分けるために、ある程度の HLA 抗体を検出できます。

### II. FlowPRA Specific ビーズの構成 (Class I 用と Class II 用があります)

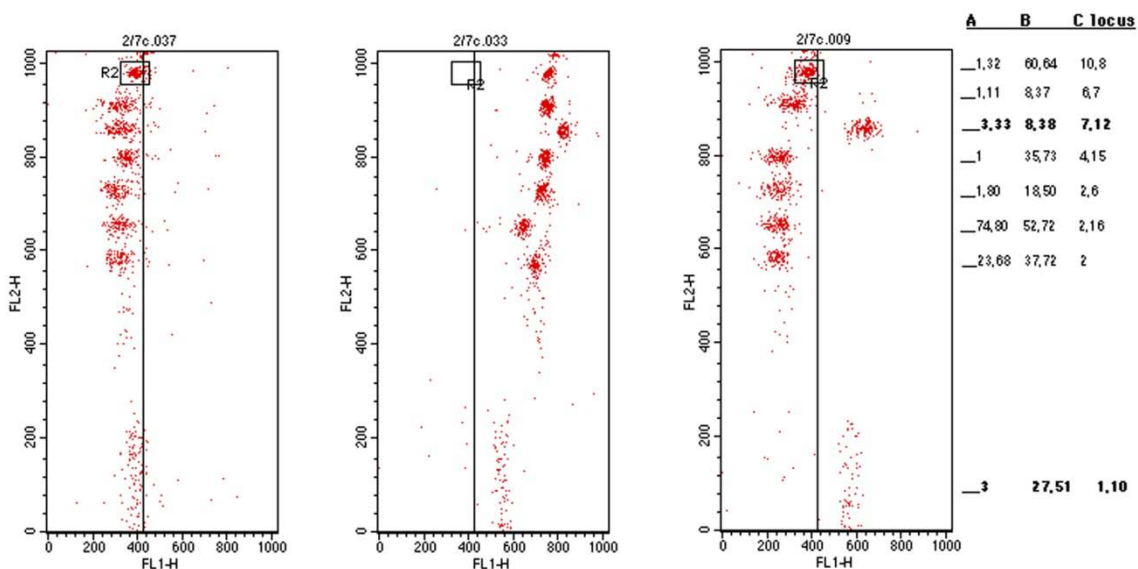


### III. FlowPRA Specific Test の例

ネガティブコントロール血清

ポジティブコントロール血清

陽性例

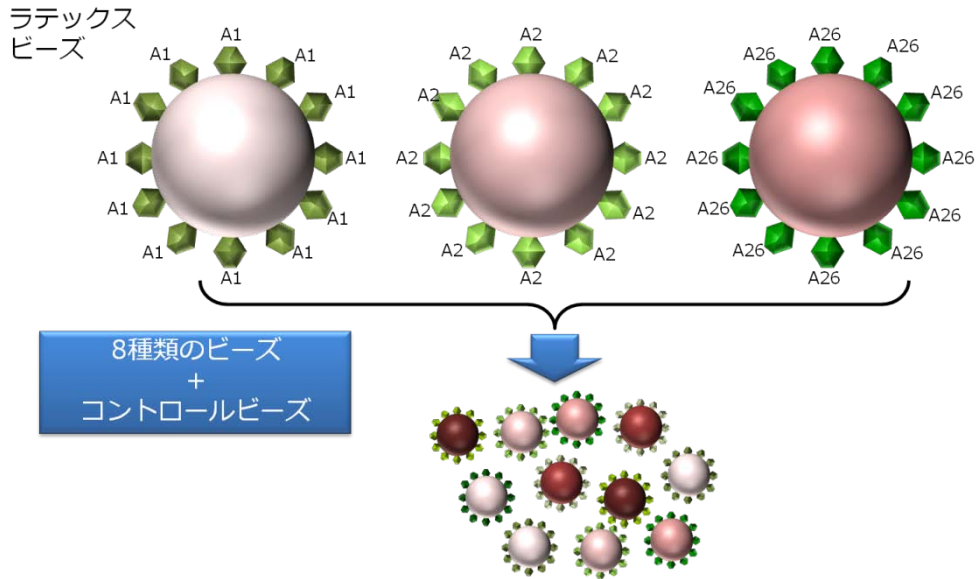


## FlowPRA Single Antigen

### I. FlowPRA Single Antigen ビーズと原理

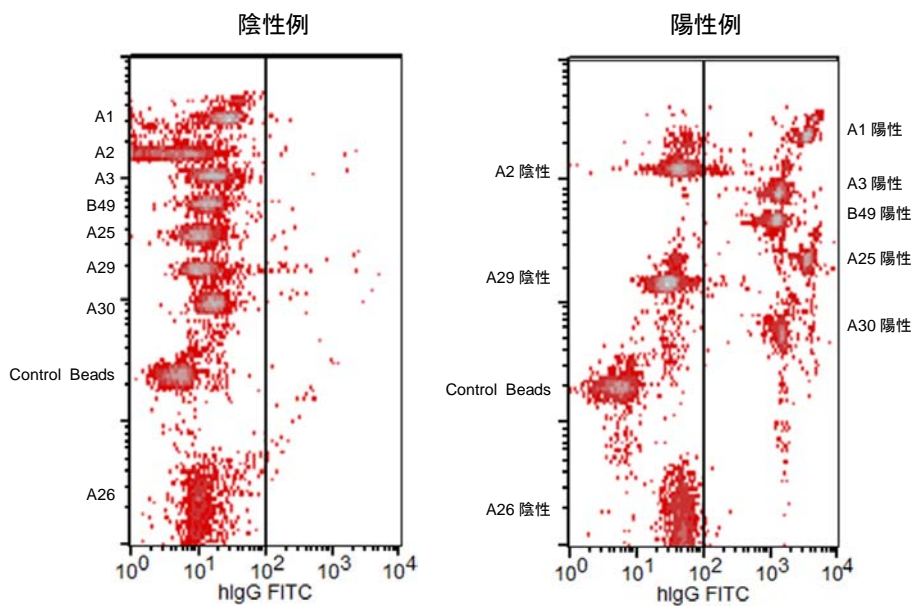
同一特異性のリコンビナントのHLA 精製抗原をPE 蛍光が異なるラテックスのビーズ上にコーティングしています。PE 蛍光でビーズの位置を分けるために、特異的なHLA 抗体を検出出来ます。

### II. FlowPRA Single Antigen ビーズの構成 (Class I 用と Class II 用があります)



### III. FlowPRA Single Antigen の例

(FlowPRA Class I Single Antigen - Group 1)



(データ提供: 社会医療法人北楡会札幌北楡病院 臨床検査技術部 佐藤 壯先生)



## FlowPRA Screening Test 操作

### I. FlowPRA Screening Test 製品内容

商品コード	キット内容	保存と有効期限	1 検体あたりの ビーズ使用量
FL1-30	<ul style="list-style-type: none"> <li>FlowPRA Class I ビーズ</li> <li>10xWash buffer</li> <li>100xFITC anti-human IgG</li> </ul>	受領後、キットの箱を開封せずに使用時まで-80℃~-65℃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)。初回使用後および/または製品の解凍後は、試薬を 2℃~5℃に保管してください。一度解凍した FlowPRA ビーズまたは FITC conjugated F(ab') <sub>2</sub> anti-human IgG は再凍結しないでください。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℃~5℃に保管することができます。Wash Buffer または FITC conjugated F(ab') <sub>2</sub> 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℃~5℃に保管することができます。	5 μL
FL2-30	<ul style="list-style-type: none"> <li>FlowPRA Class II ビーズ</li> <li>10xWash buffer</li> <li>100xFITC anti-human IgG</li> </ul>		5 μL
FL12-60	<ul style="list-style-type: none"> <li>FlowPRA Class I ビーズ</li> <li>FlowPRA Class II ビーズ</li> <li>10xWash buffer</li> <li>100xFITC anti-human IgG</li> </ul>		5 μL + 5 μL

### II. 必要な試薬

下記試薬はキットに含まれておりませんので別途ご購入ください。弊社で取り扱っております。なお FlowPRA Screening キットを使用する場合、毎回必ず下記の試薬を並行してテストしてください。必要な器具につきましては、「FlowPRA 必要な消耗品リスト」(→ P9)をご参照下さい。

商品コード	商品名	梱包単位	1 検体あたりの血清使用量
FL1-PC	FlowPRA クラス I ポジティブコントロール血清	10 tests	20 μL
FL2-PC	FlowPRA クラス II ポジティブコントロール血清	10 tests	20 μL
FL-NC	FlowPRA クラス I & クラス II ネガティブコントロール血清	10 tests	20 μL
FLCNTBD	FlowPRA コントロールビーズ	10 tests	1 μL

### III. サンプル血清の前処理と準備

- 検体血清、ネガティブコントロール血清、ポジティブコントロール血清は、8000-10000 xg で遠心し、上清を回収して使用して下さい(注意点 (→P9) 参照)。
- 検体血清と並行して、ネガティブコントロール血清と ポジティブコントロール血清(Class I、Class II)についても下記と同様の操作を行って下さい。
- FlowPRA Screening Test で Class I と Class II を同時にスクリーニングする場合は、1 検体あたり Class I、Class II ビーズを各 5 μL、コントロールビーズ 1 μL をあらかじめ必要検体数分混合しておき、混合したビーズを 1 テストあたり 11 μL 使用します。

## IV. 操作方法

1. FlowPRAビーズを使用前によくボルテックスして下さい。
2. チューブに血清20  $\mu\text{L}$  (注意点 (→P9) 参照)と下記の量のビーズを入れてピペティングで混合し、シェーカーでゆっくりシェイクしながら暗所20 - 25°Cで30分間インキュベートします。シェーカーがない場合は、インキュベーションの間に1回軽くボルテックスして下さい。

	Class I ビーズ量	Class II ビーズ量	コントロールビーズ量
Class I	5 $\mu\text{L}$	—	1 $\mu\text{L}$
Class II	—	5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Class I + Class II	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$

3. 10x Wash bufferを蒸留水で希釈し、1x Wash bufferを調製します。
4. 各チューブに1x Wash bufferを1000  $\mu\text{L}$ 加えてボルテックスし、9000 xgで2分間遠心後、先の細いピペットで上清をしっかりと除去します。ビーズを吸わないように注意します。《洗浄1回目》
5. 上清を除いたペレットをほぐすために、ボルテックスします。(ドライボルテックス)
6. 各チューブに1x Wash bufferを1000  $\mu\text{L}$ 加えてボルテックスし、9000 xgで2分間遠心後、先の細いピペットで上清をしっかりと除去します。ビーズを吸わないように注意します。《洗浄2回目》
7. 上清を除いたペレットをほぐすために、ボルテックスします。(ドライボルテックス)
8. 各チューブに1x Wash bufferを1000  $\mu\text{L}$ 加えてボルテックスし、9000 xgで2分間遠心後、先の細いピペットで上清をしっかりと除去します。ビーズを吸わないように注意します。《洗浄3回目》
9. 上清を除いたペレットをほぐすために、ボルテックスします。(ドライボルテックス)
10. 1テストあたり100x FITC anti-human IgG 1  $\mu\text{L}$ をWash buffer 99  $\mu\text{L}$ で希釈し、1xFITC anti-human IgGを調製します。1x FITC anti-human IgG 100  $\mu\text{L}$ をビーズに加えてボルテックスし、シェーカーでゆっくりシェイクしながら暗所、20-25°Cで30分間インキュベートします。シェーカーがない場合はインキュベーションの間に1回軽くボルテックスします。
11. 各チューブに1x Wash bufferを1000  $\mu\text{L}$ 加えてボルテックスし、9000 xgで2分間遠心後、先の細いピペットで上清をしっかりと除去します。ビーズを吸わないように注意します。《洗浄1回目》
12. 上清を除いたペレットをほぐすために、ボルテックスします。(ドライボルテックス)
13. 各チューブに1xWash bufferを1000  $\mu\text{L}$ 加えてボルテックスし、9000 xgで2分間遠心後、先の細いピペットで上清をしっかりと除去します。ビーズを吸わないように注意します。《洗浄2回目》
14. 上清を除いたペレットをほぐすために、ボルテックスします。(ドライボルテックス)
15. 1xWash buffer 500  $\mu\text{L}$ をチューブに加え、スポイトでフローサイトメーター用のチューブに移します。  
これで測定準備が完了です(あるいは遮光して2-5°Cで24時間までは保存可能です)。

初期設定時などゆっくり長く流したい時は、この最終液量は500  $\mu\text{L}$ 程度まではフレキシブルに変更可能です(また、機種によっても最低液量が異なることがありますのでご確認下さい)。

翌日読む場合はFixing solution: PBS with 0.5% formaldehyde (add 1.35 mL 37% formaldehyde to 100 mL PBS)を使用することをお勧めします。

**注意点:**

- 血清は使用する前に凍結することを推奨しています。
- バックグラウンドの高い血清は、超遠心(100,000 xg)で10分から15分遠心します。
- 患者血清20 µL~50 µL使用することにより、感度が高くなります。
- ホルムアルデヒドは人体に有害なため、その日のうちに測定する場合はWash Bufferを使用して測定することを推奨します。Fixing solutionは調製後2週間で劣化しますので、2週間以内にご使用下さい。
- 使用するチューブは、なるべく細い遠沈管でロスの少ないものを使用して下さい。
- 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下さい。本製品に用いられている血液由来材料は現在のFDA基準に適合する試験では陰性ですが、既存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。

**VII. 参考資料: FlowPRA 必要な消耗品リスト**

必要な器具	メーカー
1.5 mL マイクロ遠心チューブ	指定なし
1.5 mL マイクロ遠心チューブ用高速遠心機 (8,000-10,000 xg が出せるもの)	指定なし
ボルテックスミキサー	指定なし
シェーカー	指定なし
P-10 マイクロピペット・チップ	指定なし
P-20 マイクロピペット・チップ	指定なし
P-200 マイクロピペット・チップ	指定なし
P-1000 マイクロピペット・チップ	指定なし
50 mL ファルコンチューブ	指定なし
プラスチック製ディスポピペット(先端ができるだけ細いもの) ※参考商品	アズワン 1-4654-05 ピペット E-231
蒸留水	指定なし
タイマー	指定なし
アルミホイル	指定なし
キムタオル	指定なし
FACS チューブ	測定機器メーカー指定のもの

## FlowPRA Screening Test のフローサイトメーター条件設定

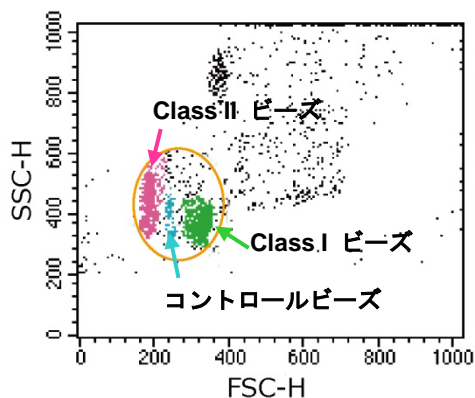
FlowPRA の測定では正しいデータをとるために、最初にフローサイトメーターの条件設定を正しく行うことが非常に重要です。この設定を保存し、以降呼び出して使用すれば、基本的には微調整のみで測定できます。

FlowPRA Screening Test を読み取るためには、

- 1) 陰性コントロール血清
- 2) Class I 陽性コントロール血清
- 3) Class II 陽性コントロール血清
- 4) コントロールビーズ

を検体血清と同時に流す必要があります。

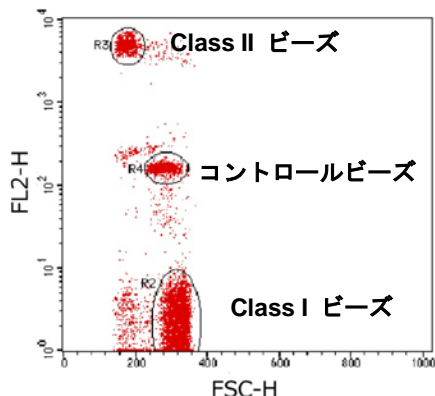
### I. FSC vs. SSC



FlowPRA Screening Test Class I、Class II、コントロールビーズの FSC vs. SSC ドットプロット

ビーズの半径は約 2 ~ 4  $\mu\text{m}$  のため、「リンパ球向けのモード」で解析している場合は感度を上げて下さい。

### II. FL2 vs. FSC

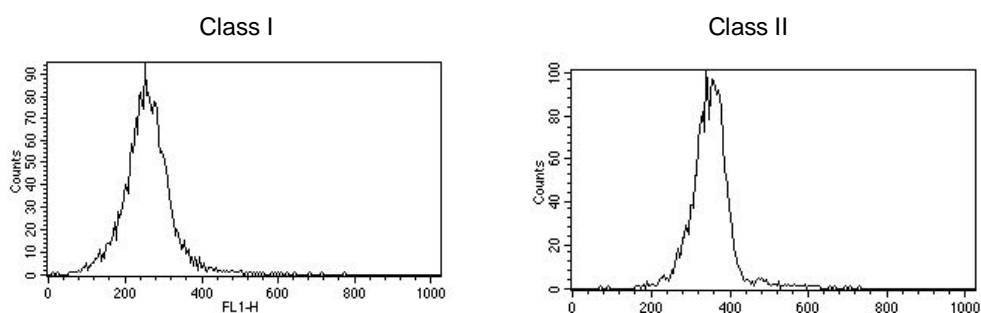


FlowPRA Screening Test Class I、Class II、コントロールビーズの FL2 vs. FSC ドットプロット

Class II ビーズおよびコントロールビーズにはビーズに色素が含まれているため、PE の蛍光強度により領域を分けることが出来ます。

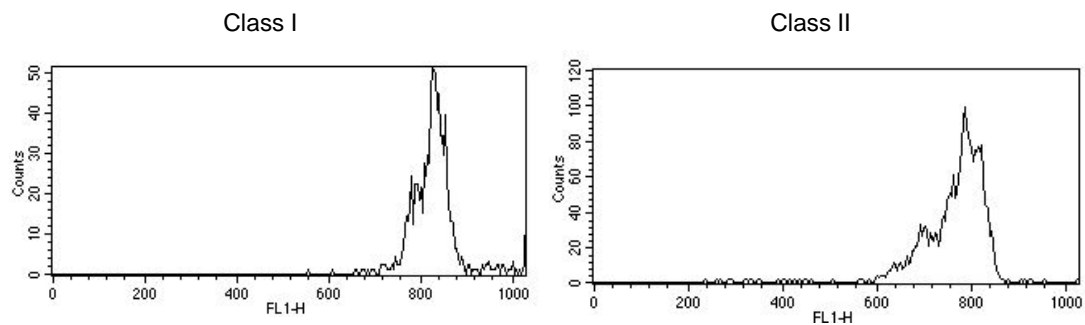
### III. FL1 ヒストグラム

#### 1. ネガティブコントロール血清



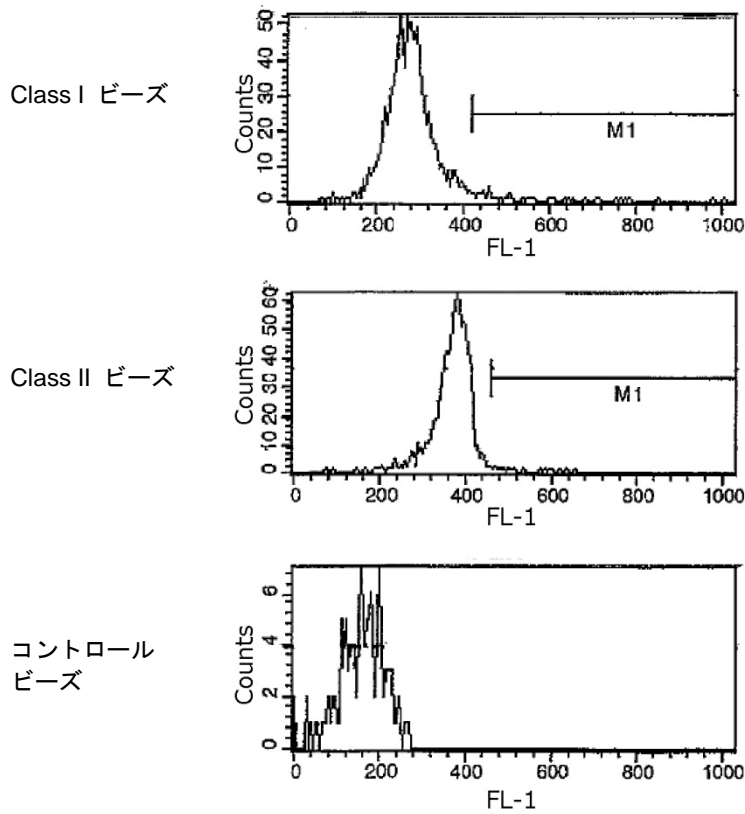
ネガティブコントロール血清を検体と同時に流す目的は、陰性血清を基準に陽性領域と陰性領域を決めることです。

#### 2. ポジティブコントロール血清



ポジティブコントロール血清を検体と同時に流す目的は、二次抗体が働いているかを確認するためです。

### 3. コントロールビーズを流す意義



#### 陰性コントロール血清に Class I、Class II とコントロールビーズを反応させた際の FL1 ヒストグラム

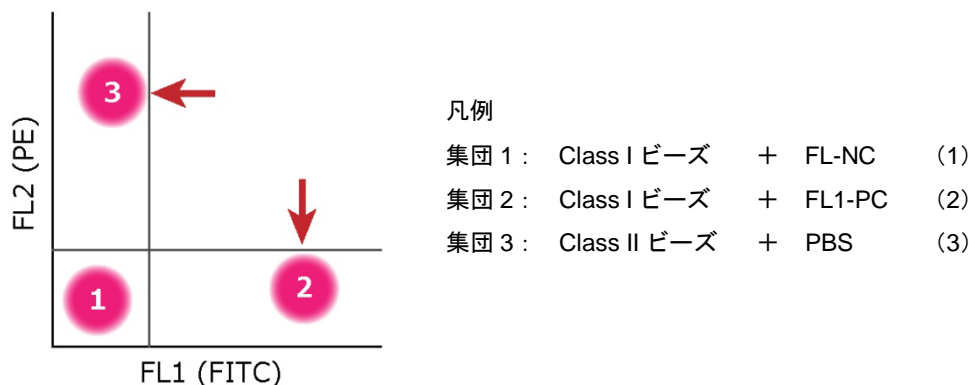
コントロールビーズを他のビーズと混合して流す目的は、血清中の非特異反応の有無を確認することです。HLA 抗体陰性の検体にも関わらず非特異反応によりヒストグラムが右側にシフトする場合がありますため、コントロールビーズのヒストグラムを基に非特異反応または陽性反応かを判断します。

※ FlowPRA Specific Test、FlowPRA Single Antigen は、ビーズミックスの中にコントロールビーズが混合されています。

#### IV. コンペーンションの調整（蛍光補正）

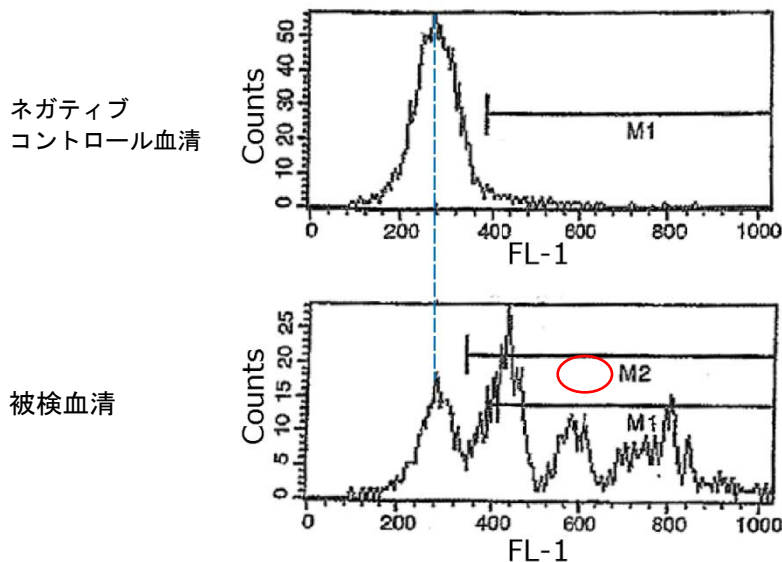
コンペーンションとは、2種類以上の蛍光の測定において、それぞれの蛍光の波長が重なり合う場合（例：FITCとPE）、互いの検出器にいわゆる「光漏れ」が起きるため、電氣的に補正するものです。

1: Class I ビーズ + ネガティブコントロール血清 (FL-NC)、2: Class I ビーズ + Class I ポジティブコントロール血清 (FL1-PC)、3: Class II ビーズ + PBS を混合したビーズをフローサイトメーターに流し、集団の位置を調整します。



- 集団 2 は上にずれる傾向なので、下に寄せて集団 1 と 2 が X 軸と並行な位置に来るように調整 (FL2-%FL1 の値を上げる)
- 集団 3 は右にずれる傾向なので、左に寄せて集団 1 と 3 が Y 軸と並行な位置に来るように調整 (FL1-%FL2 の値を上げる)

#### V. マーカー設定の考え方

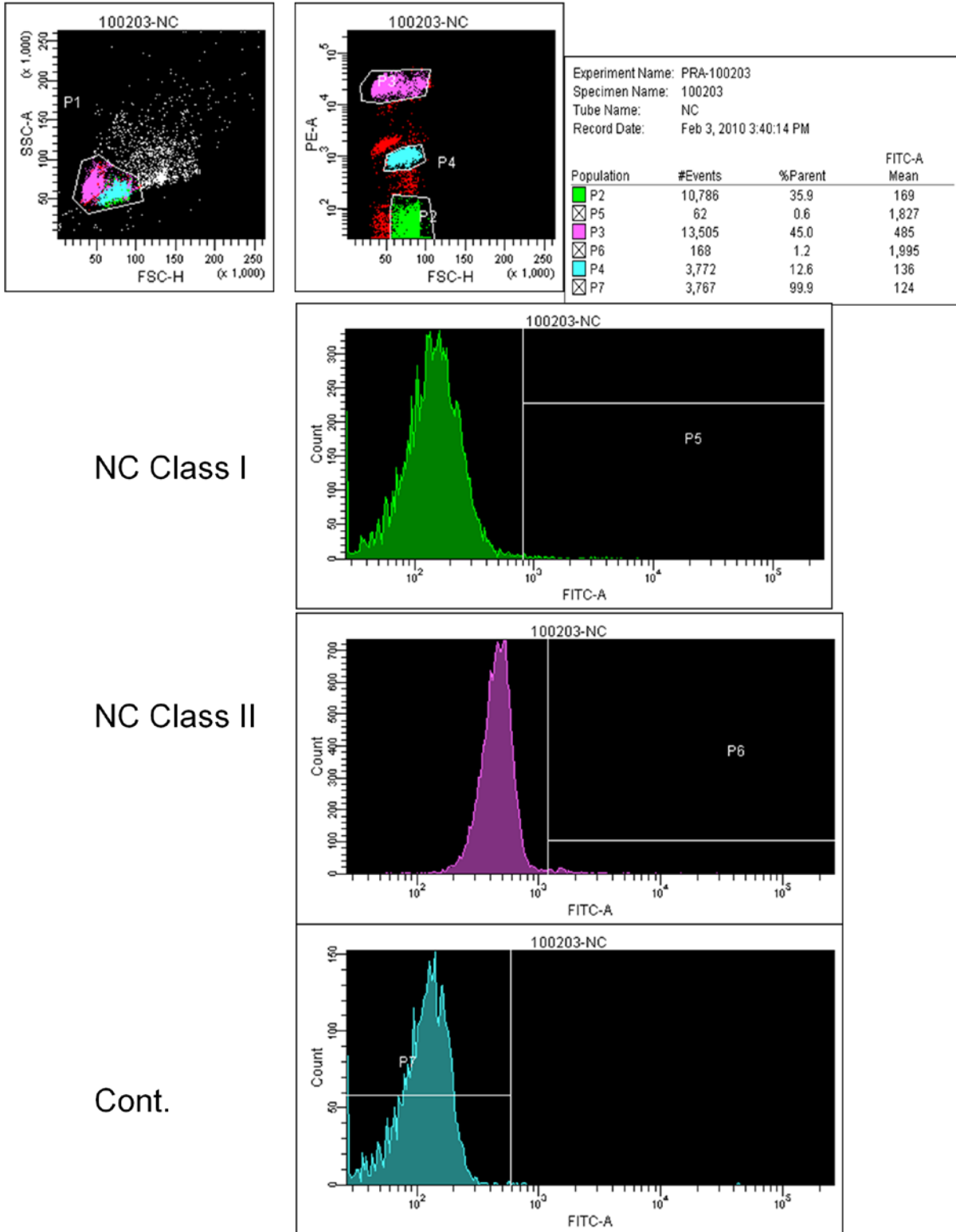


Class I ビーズ・Class II ビーズ・コントロールビーズと血清を反応させた場合の Class I ヒストグラム

検体血清が図のようにネガティブピークがはっきり分かる形状の場合、ネガティブコントロール血清で設定した M1 をそのまま用いるのではなく、ネガティブピークのすぐ横のピーク谷間に合わせて M2 を再設定して %PRA を求めます。

## FlowPRA Screening Test データ例

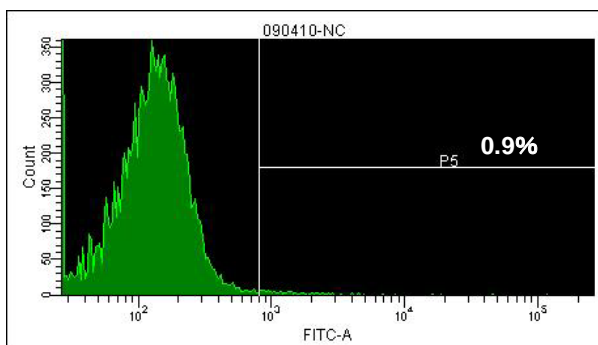
### I. Class I ビーズ・Class II ビーズ・コントロールビーズとネガティブコントロール血清を反応させた場合のヒストグラム





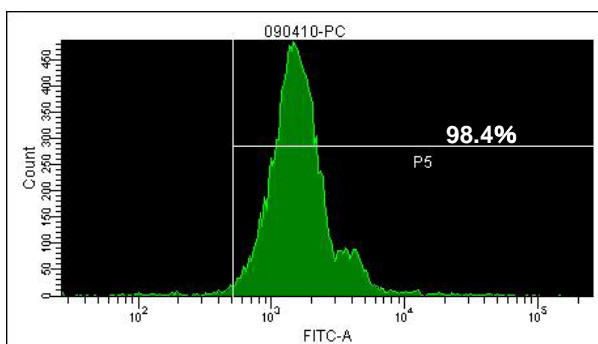
## II. Class I ビーズに対する陰性 / 陽性検体のヒストグラム

陰性検体



Class I のネガティブコントロール血清 (P14)のヒストグラムと比較して、波形がほぼ同一の位置にあり、形状も同一です。

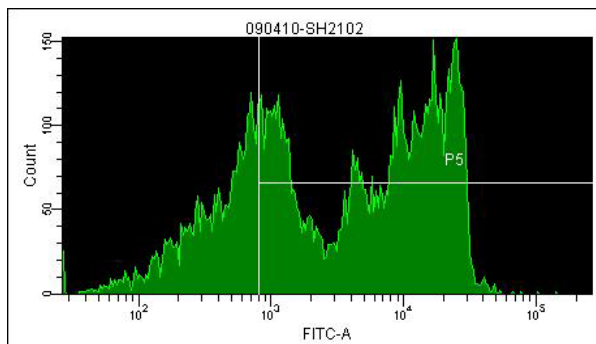
陽性検体



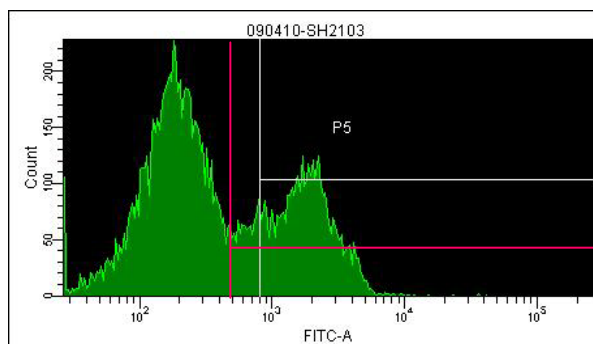
Class I のネガティブコントロール血清 (P14)のヒストグラムと比較して、波形が右側へシフトしており、多峰性を示しています。

### Class I 抗体 陽性検体のヒストグラム例

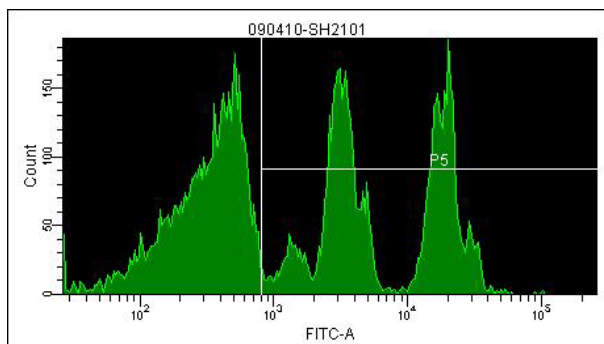
①



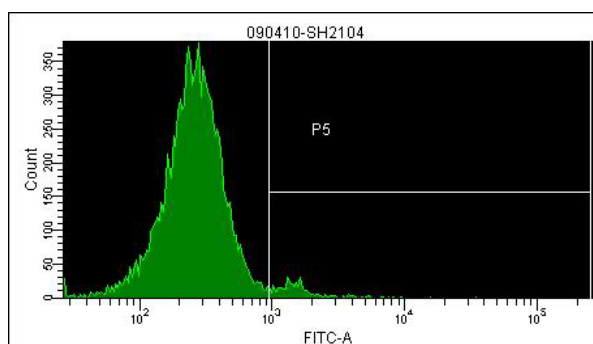
②



③



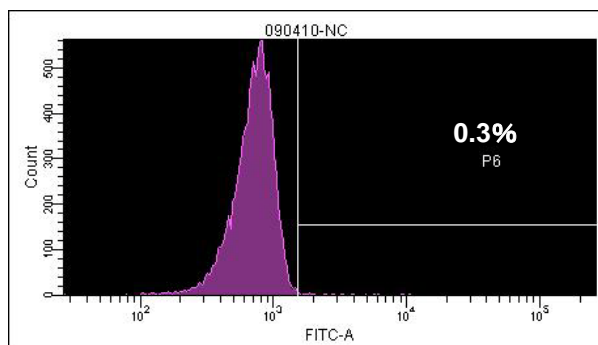
④



- ①、②、③は波形が右側にシフトしており、明らかに多峰性を示しています。
- ②は一番左側のピークの横に新たなライン(—線)を引き直すことにより、%PRAを変更します。
- ④は小さい山が右側にシフトしており、弱陽性の HLA 抗体があると思われます。

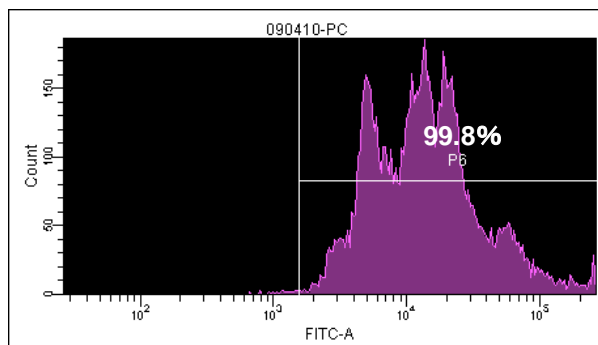
### III. Class II ビーズに対する陰性 / 陽性検体のヒストグラム

陰性検体



Class II のネガティブコントロール血清 (P14) のヒストグラムと比較して、波形がほぼ同一の位置にあり、形状も同一です。

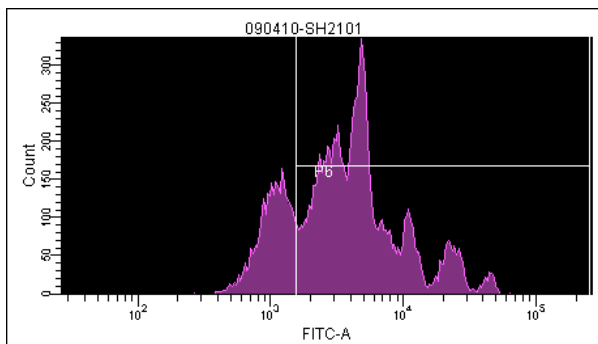
陽性検体



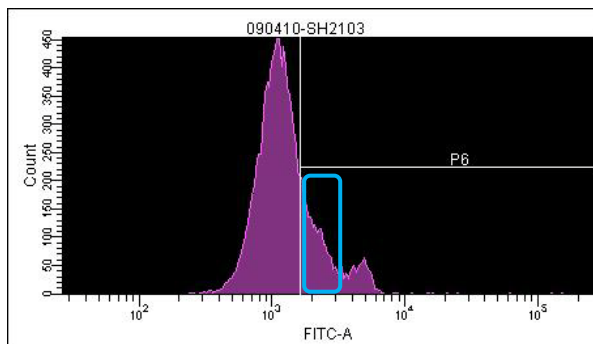
Class II のネガティブコントロール血清 (P14) のヒストグラムと比較して、波形が右側へシフトしており、多峰性を示しています。

#### Class II 抗体 陽性検体のヒストグラム例

①



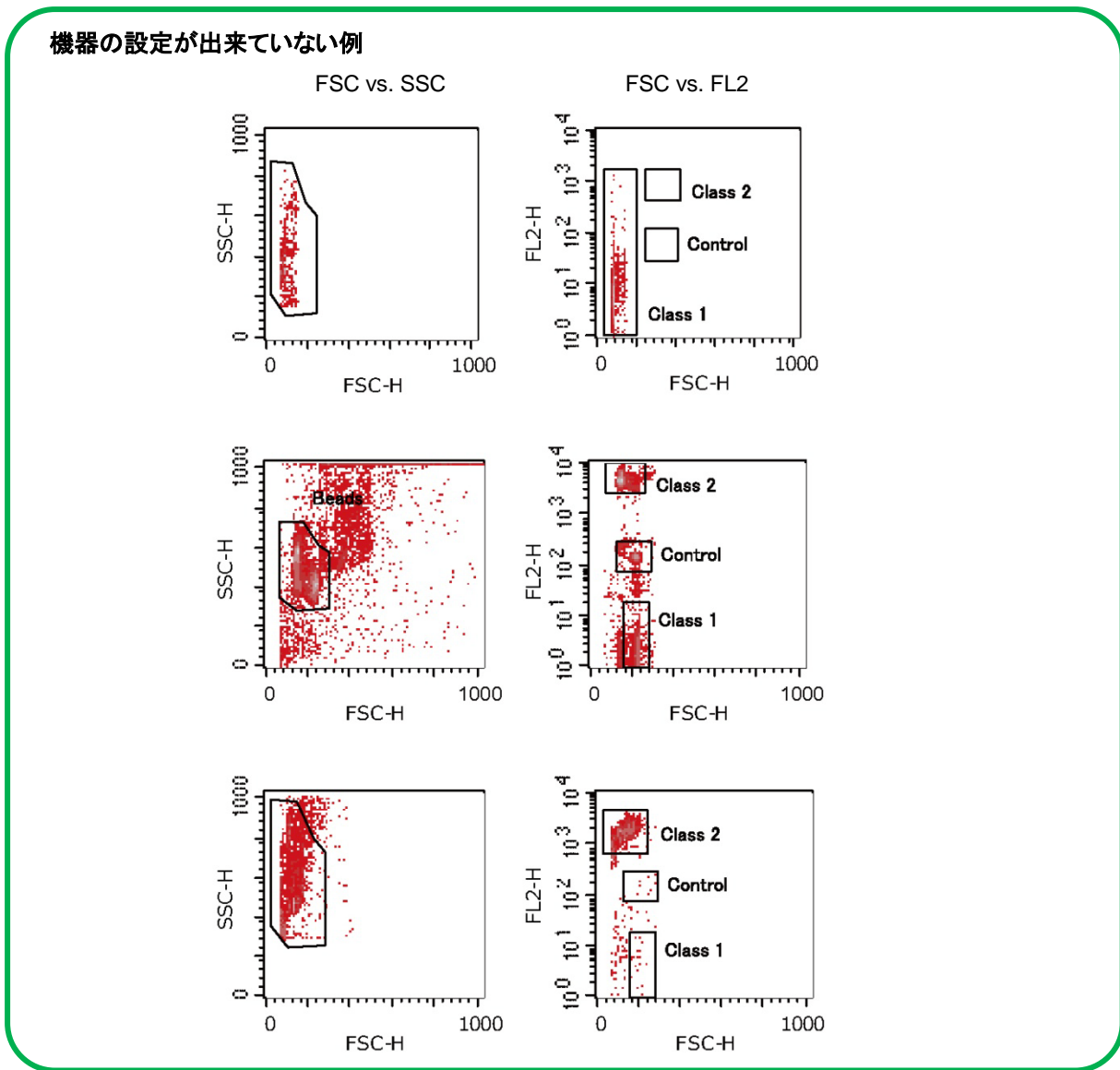
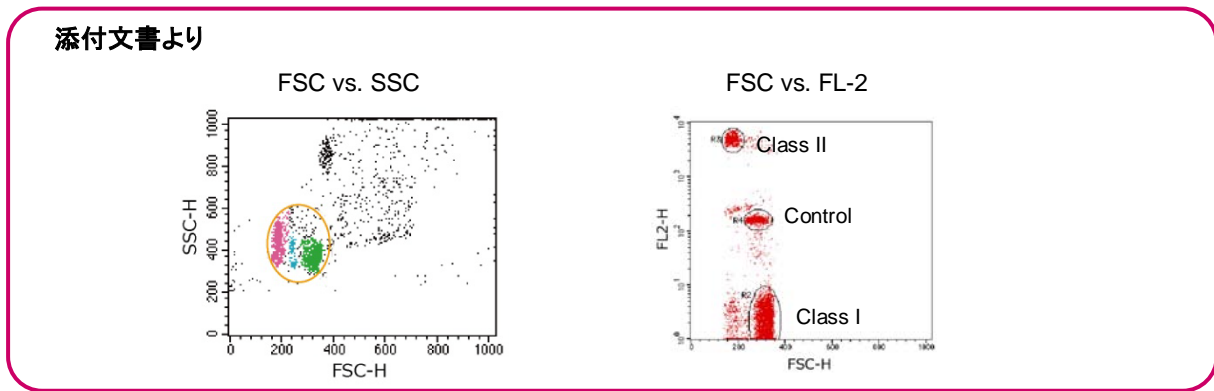
②



- ①は波形が右側にシフトしており、明らかに多峰性を示しています。
- ②は小さい山が右側に見えます。また、ピークの右側の部分(□印)が少し膨らんでいます。

## 機器設定の重要性

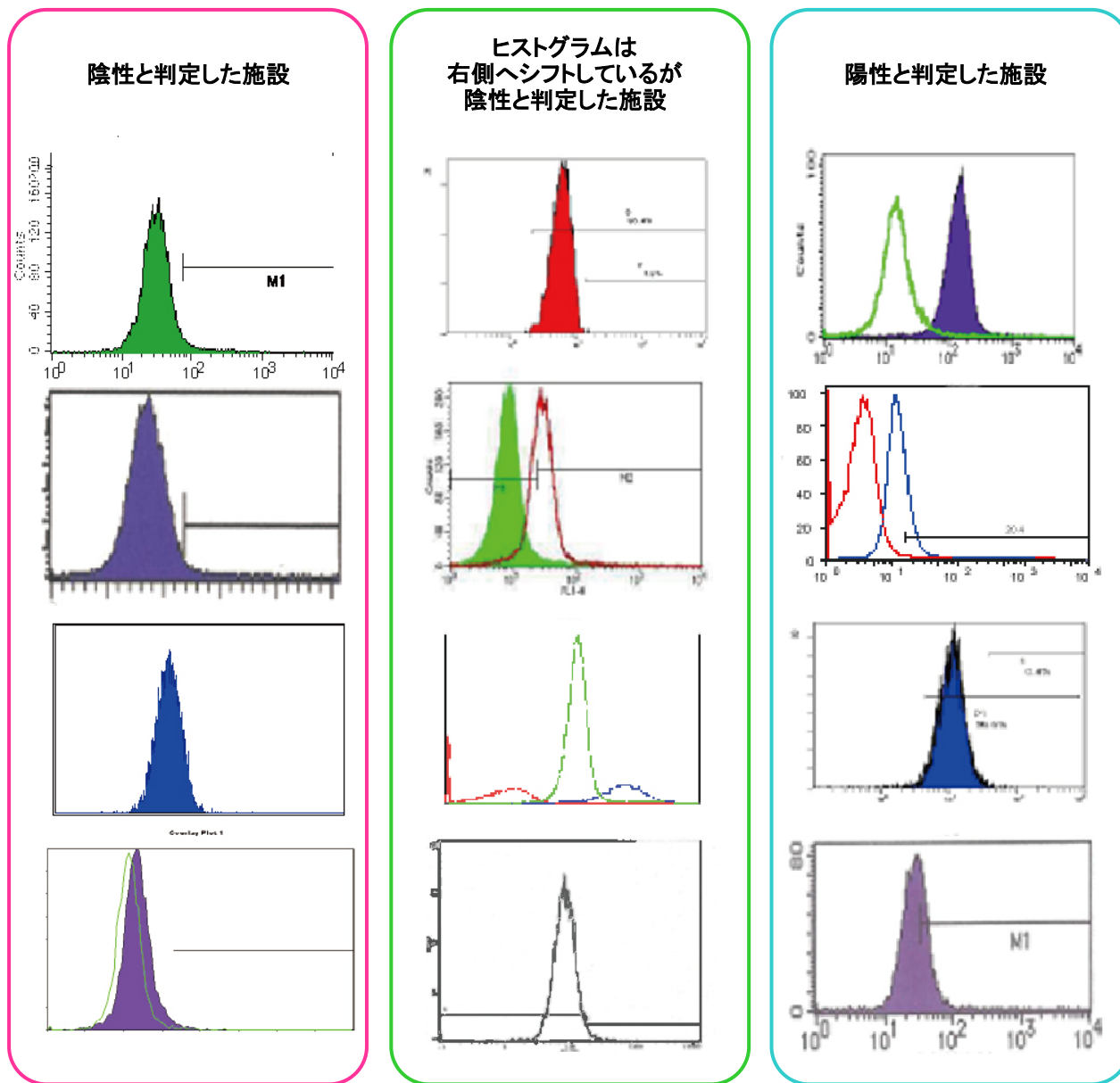
添付文書と同じプロットが描けているか、確認します。



(日本組織適合性学会 HP 第 12 回 QCWS 報告書データ 引用)

## FlowPRA Screening Test ケーススタディー【1】

同一検体(HLA Class I 抗体陰性の検体)を、FlowPRA Screening Test Class I で測定したものです。  
異なる施設およびフローサイトメーターで測定した例を下图に示します。



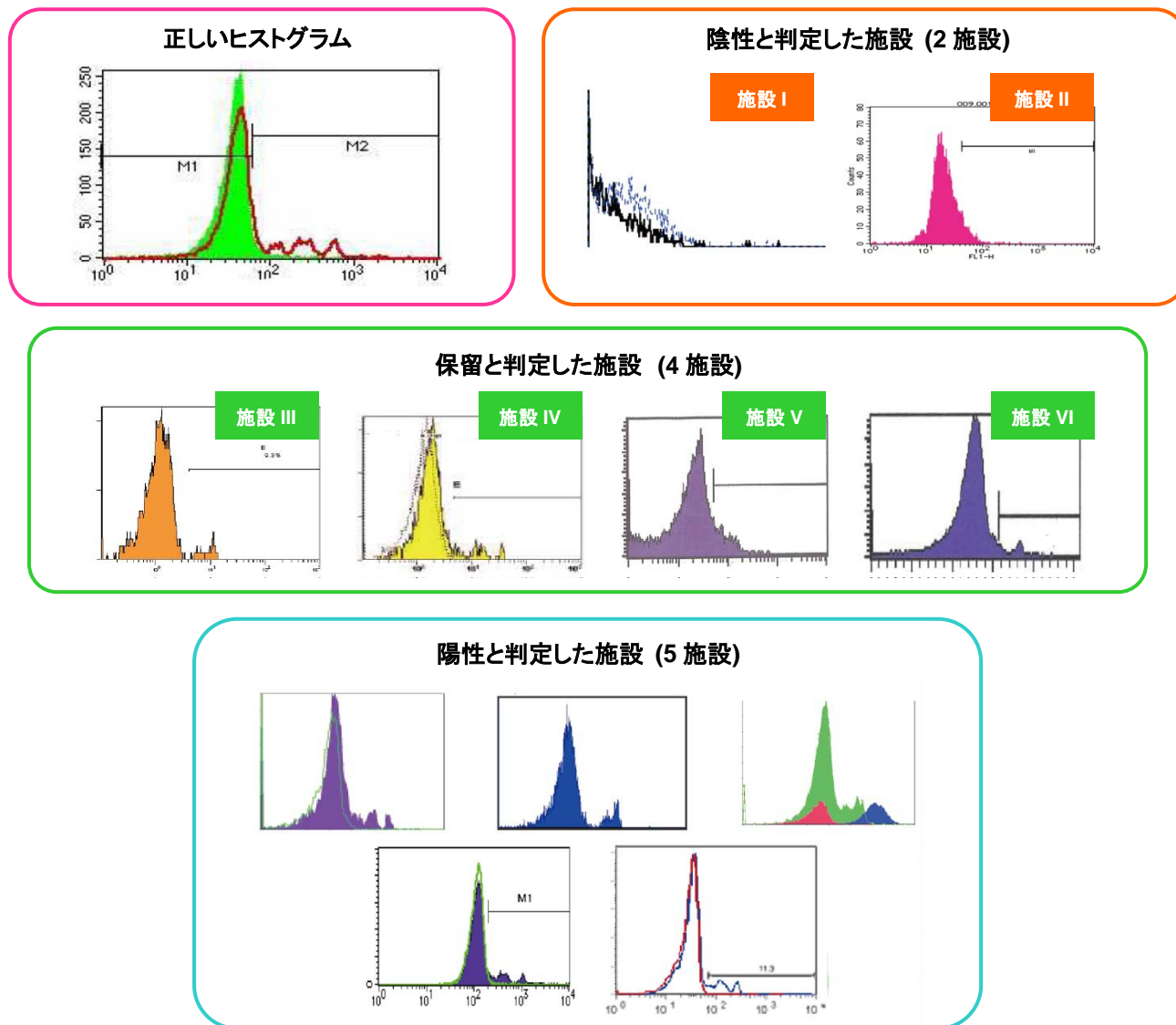
### 説明:

ヒストグラムのパターンが大きく2パターンに分かれました。すなわち、ネガティブコントロールと同じ位置に検体血清のピークが出た施設、ネガティブコントロールよりも右側にシフトした施設がありました。さらに検体血清が右側にシフトした場合、陰性と判定した施設や陽性と判定した施設がありました。検体血清のヒストグラムは右側にシフトしていますが、**波形がシングルピークで、かつネガティブコントロール血清とほぼ同形のため陰性と判断します**。検体血清が右側にシフトした原因として、①**コンペンセーション調整が合っていない**、②**洗浄が悪い**、③**機器の差**などが考えられます。

(日本組織適合性学会 HP 第12回 QCWS 報告書データ 引用)

## FlowPRA Screening Test ケーススタディー【2】

同一検体(HLA Class II 抗体弱陽性の検体)を、FlowPRA Screening Test Class II で測定したものです。  
異なる施設およびフローサイトメーターで測定した例を下图に示します。



### 説明:

陰性と判定とした2施設について、「施設 I」は**機器の適切なコンペーション調整が出来ていません**。「施設 II」はシングルピークのため陰性と判断しています。「施設 II」は**サンプル調製の手技に問題**があると考えられます。使用する血清をよく遠心し、ビーズと血清との反応を行った後、洗浄や二次抗体のラベリングを正確に行うことをおすすめします。

保留と判定した「施設 III」、「施設 IV」、「施設 VI」は、右側に見られる小さなピークを陽性と判断して構いません。

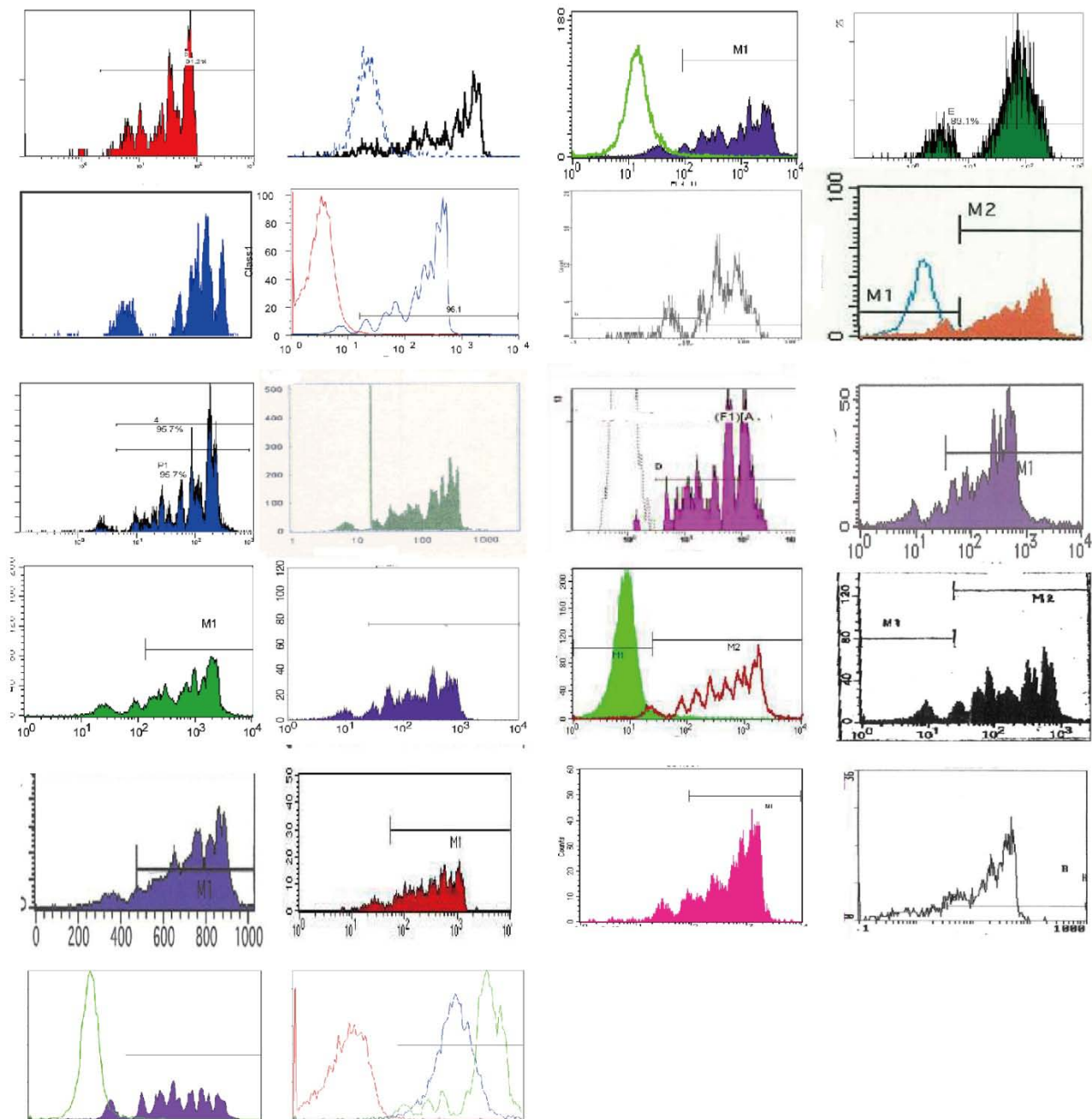
「施設 V」は多施設と比べてほとんど右側のピークがほぼ見えず、**二次抗体のラベリングが出来ていない可能性**があります。洗浄時(特に二次抗体の添加前)は、上清をしっかりと除去して下さい。再度検査することをおすすめします。

(日本組織適合性学会 HP 第 12 回 QCWS 報告書データ 引用)

## 日本組織適合性学会 QCWS 参加施設のデータ例

同一検体を用いて FlowPRA Screening Test Class I を行った際の、QCWS 参加施設のヒストグラム (raw data) です。同一の血清を用いたにもかかわらず、様々なヒストグラムが得られます。

各施設の機器においてピークの出方や波形の傾向を把握することによって、弱陽性の HLA 抗体反応や非特異反応を見つけることができ、検査の精度を上げることができます。



(日本組織適合性学会 HP 第 12 回 QCWS 報告書データ 引用)

### 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: TEL 03-3593-3385 E-mail [techservice@veritastk.co.jp](mailto:techservice@veritastk.co.jp)



VERITAS USER MANUAL

日本総代理店

株式会社

**ベリタス**

〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14  
住友東新橋ビル3号館5階

TEL.03-5776-0078(代) FAX.03-5776-0076

E-mail: [veritas@veritastk.co.jp](mailto:veritas@veritastk.co.jp)

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

Ver. 1.05 (2012/Sep)

DOLM-12-0187