

# LAT 試薬取り扱い説明書 研究用試薬

注：これはOneLambda社の英文マニュアルの**部分訳**です。補助用ですので、使用の際は必ず英文マニュアルを参考に行ってください。

## 1. はじめに

LAT は、ヒト血清中の HLA Class または Class に対する IgG 抗体を ELISA 法の原理で検出する試薬です。テラサキトレーの各ウェルにアフィニティー精製された HLA 抗原が貼り付けてあり、サンプル血清を加えてインキュベーションしたあとに、ヒト IgG のみを認識するアルカリフォスファターゼ (AP) 結合抗体で検出します。OD 値を測定し、抗体特異性を定量的に分析することができます。

## 2. キット構成

		LAT	LATM	
		96-Well Trays—LAT140, LAT140X2, LAT 240, LAT1240, LAT1288, LAT1HD	LATM10X5	LATM20X5 LATM120 LATM220
試薬名	濃度	テスト数および試薬のVolume		
Micro ELISA tray	-	1 Test/トレー、20トレー入り 2Test/トレー、20トレー入り	10 Test/トレー 5トレー入り	20 Test/トレー 5トレー入り
Serum Control	10X	Reconstitute後、0.2mL	Reconstitute後、0.1mL	
Sterile Deionized Water (Serum Control希釈用)	-	1mL	1mL	
AP結合anti-human IgG抗体	100X	0.3mL	0.1mL	
Antibody Diluent	1X	50mL	12mL	
Wash Buffer	10X	125mL	30mL	
Colorimetric Enzyme Substrate AおよびB	1X	各15mL	各3mL	
Stop Reagent	1X	25mL	6mL	

## 3. キットの他に必要な器具・試薬

- ・ テラサキトレーを読むことができる ELISA リーダー (コード：ELX800NB 品名：ELISA Tray Reader)
- ・ プリンター
- ・ 血清希釈用の 1.5mL マイクロ遠心チューブ
- ・ Wash buffer 用のプラスチックボトル
- ・ 脱塩水 (900mL)
- ・ ピペット (連続式の電動シングルピペットが便利)
- ・ チップ

## 4. キットの保存

- ・ 試薬は 2-5 で保存してください。
- ・ 一度 Reconstitute した Serum Control は、1 ヶ月以内に使用する場合 2-5 、長く保存したい場合は分注して -20 に保存してください。
- ・ LAT トレーは湿気を避け、2-5 に保存してください。一度開封した使いかけのアルミバッグは、再度よく密封して保存してください (中に入っている乾燥剤は捨てないで下さい)。
- ・ 清潔な器具を使用し、有効期限切れやコンタミが疑われる試薬は使用しないでください。

## 5. 検体

- ・ 検体血清は、採取後できるだけ早くテストしてください。
- ・ 検体血清は必ず付属の Antibody Diluent で希釈してください。EDTA を含む希釈液は使用しないでください。
- ・ 熱処理した血清はバックグラウンドが高くなりますので使用しないでください。

## 6. 使用方法

### A. 試薬の準備

1. アッセイの少なくとも 20 分前に、凍結乾燥の **Serum Control** を 0.1mL または 0.2mL (ラベルに表示されています) の **Sterile Deionized Water** (キットに入っています) で溶かしておく。
2. アッセイの直前に、検体血清を **Antibody Diluent** で希釈する (LAT は 1 : 3、LATM は 1 : 2 で希釈。ただし LAT では、プレスクリーニングにより強い陽性を示す可能性が示唆された時は、必要に応じてより希釈率を上げてよい)

#### 【検体血清の希釈方法】

Product NO.	Dilution Factor	Per Test	
		検体血清	Ab Diluent
LATM10X5	1 : 2	38 $\mu$ L	38 $\mu$ L
LATM20X5	1 : 2	24 $\mu$ L	24 $\mu$ L
LAT1288、LAT1HD	1 : 3	400 $\mu$ L	800 $\mu$ L
	1 : 5*	240 $\mu$ L	960 $\mu$ L
	1 : 10*	120 $\mu$ L	1080 $\mu$ L
LAT1240、LAT240、 LAT140、LAT140X2	1 : 3	200 $\mu$ L	400 $\mu$ L
	1 : 5*	120 $\mu$ L	480 $\mu$ L
	1 : 10*	60 $\mu$ L	510 $\mu$ L

\* オプション

3. 同じくアッセイの直前に、1.で作った **10X Serum Control** をトレ-1 枚あたり 8  $\mu$ L とって Antibody Diluent 72  $\mu$ L で希釈する。
4. 最初の洗いのステップの直前に、**100X AP 結合 anti-human IgG 抗体** をトレ-1 枚あたり 10  $\mu$ L とって Antibody Diluent 990  $\mu$ L で希釈する。
5. **10X Wash buffer** をトレ-1 枚あたり 5mL とって、45mL の脱塩水で希釈する。
6. 2 回目の洗いのステップの直前に、**Colorimetric Enzyme Substrate A および B** を等量ずつ混合する (トレ-1 枚あたり各 500  $\mu$ L)。ストック液がコンタミしないよう、ピペットチップはその都度かえてください。

### B. プロトコール

注 1 : どのウェルに何を加えたらよいかはキットによって異なります。詳細は英文添付文書 1 ページ目の表や Worksheet でよく確認して行ってください。

注 2 : ウェルの底には抗原がコーティングされていますので、チップの先端等でウェルの底にタッチしないようにしてください。

1. ウェルに 10  $\mu$ L の希釈済み検体血清を入れる。
2. トレーにフタをし、20-25 °C で 1 時間インキュベートする (以下インキュベートの際は、ゆっくり振とうするシェーカーを使用しても可)。
3. フリック操作で液を捨て、ペーパータオル上でトレーを伏せてたたきつけるようにして、さらに液を落とす (1  $\mu$ L 程度液が残った状態になる)。ウェルを乾燥をさせないよう、次の試薬を加えるまでトレーを伏せたままにしておくことよい。
4. すべてのウェルが液でかぶる程度に **1X Wash buffer** を流し込み (あるいはマルチチャンネルピペットで、すべてのウェルに 15-20  $\mu$ L を加え) 軽くゆすったあと、3.と同様の方法で Buffer を除く。
5. 4.をもう一度繰り返す。

6. 10  $\mu$ L の希釈済み AP 結合 anti-human IgG 抗体をすべてのウェルに分注する。( 残った試薬は廃棄)
7. トレーにフタをし、20-25 で 40 分間インキュベート。
8. 3.と同様の方法で AP 結合 anti-human IgG 抗体を除く。
9. 4.の洗いの操作を 2 回繰り返す。
10. 10  $\mu$ L の酵素基質をすべてのウェルに分注する。( 残った試薬は廃棄)
11. トレーにフタをし、遮光をして 37 で 10-15 分間インキュベート。  
注:インキュベーションの時間はいつも一定にすることをおすすめします( 15 分以上はインキュベートしないでください)。また酵素反応のため 37 は正確に守ってください。最終的に Positive Control ウェルは濃い青色、Negative Control ウェルは透明であることを確認してください。
12. 5  $\mu$ L の Stop Reagent をすべてのウェルに加えて反応を止める。
13. テラサキトレーに対応した ELISA リーダーで 1 時間以内に測定する (測定時はフタをとること)。フタをして 2-5 で保存すれば反応を停止させてから 3 日間は再測定をすることができます。ただし、OD 値は全体的に若干低くなり、弱い反応は消えてしまうことがあります。

## 7. 結果

- A. No Antigen Control ( NAC ) ウェルの OD 値の平均を出し、他のすべてのウェルの OD 値から差し引く (これで血清由来のノンスペや試薬由来のバックグラウンドを差し引いたこととなります。洗いの操作がきちんとできていれば、Antibody Diluent を用いた場合の NAC の平均 OD 値は通常 0.25 以下になるはずです)。
- B. Negative HLA serum control ウェルと Positive HLA serum control ウェル (とオプションで QA control ウェル) の平均 OD 値をそれぞれ出す。その値で Pos. HLA value/Neg. HLA value ( Pos/Neg Ratio ) を求める。この時もし、NAC の値が Negative HLA value よりも大きいまたはほぼ同じ場合は、Negative HLA ( Negative HLA-NAC ) value の値を代わりに用いる ( Pos/Neg Ratio が、0 や数千という値にならないようにするため)。輸血歴のない男性 200 パネルについて LAT アッセイを行ったところ平均値が 50 であったことから、これをデフォルト値とする。
- C. 確実なアッセイ結果を得るため、下記の最適値を確認する。

パラメータ	最適な値	下限
QA	OD $\geq$ 2.0	OD=1.0
Pos. HLA	OD $\geq$ 1.5	OD=0.8
Pos/Neg HLA	Ratio $\geq$ 10.0	Ratio $\geq$ 5.0

Positive control ウェルには、抗原の安定性と反応性を確認する目的があります。Pos/Neg Ratio が 20 のとき“ 2 ”も Positive ととることができ、それ以下の時は通常“ 4、6、8 ”を Positive とします。Pos/Neg Ratio が  $\leq$  10.0 になる原因として、洗いの操作がきちんとできていないなどが考えられ、こういったケースでは“ 6、8 ”だけが確実にバックグラウンドを越えている反応としてみるすることができます。これ以下の弱い反応は、実際反応している可能性もあるものの、信頼性が低いので Positive とみなしません ( LATM アッセイでは、カットオフ値に近いところの結果についてはさらなる検討が必要 )。

- D. A.でバックグラウンドを差し引いた後、Positive serum control の平均 OD 値に 0.2 をかける (これが Positive カットオフ値となる)。この値より OD 値が大きい試験ウェルが Positive と考えられます。
- E. D.で計算した値を従来の細胞毒性のデータに変換するため、以下のカットオフ値に沿って各試験ウェルの Reaction code ( 1、2、4、6、8 ) を決める。
  - 0-10% = 1 ( Negative reaction )
  - 11-20% = 2 ( Weak positive reaction または Negative reaction )
  - 21-50% = 4 ( Positive reaction )
  - 51-80% = 6 ( Strong positive reaction )
  - 81-100%=8 ( Very strong positive reaction )
- F. **LAT140, LAT 240, LAT1240, LAT1288, LAT1HD** に関して

1. %PRA を計算するには、カットオフ値を超える OD 値を与えたウェルの数を Total の抗原ウェル数で割る (注: LAT1HD では、この計算は行いません)。

$$\%PRA = \frac{\# \text{ of positive wells}}{n} \times 100$$

小数点以下は切り捨て。検出下限はキットのパネル数による (e.g. Class で n = 40 のとき 2.5% PRA、Class で n = 32 のとき 3%PRA など)。OneLambda では、1:3 で希釈した血清の場合“ 4 ”をカットオフ値とすることをすすめています。

2. 抗 HLA 抗体特異性の決定：E.で求めた Reaction code をワークシート (または解析ソフト) に記入し、反応パターンを解析する。従来の細胞毒性試験と同様、各血清はそれぞれ異なる力価を持つ。それにあわせて“ 8 ”あるいは“ 6、8 ”あるいは“ 4、6、8 ”を Positive とする、などの対応が考えられます。逆に力価の弱い血清では“ 2 ”であっても Positive の場合もあります。このようなケースでは、希釈率を下げて再検することをおすすめします。
3. 特異抗体を同定する **Strength Index (S.I.)** は、従来の細胞毒性試験と同様“ 4、6、8 ”の反応を示したウェルの総数中に占める“ 8 ”の割合 (% “ 8 ” Reaction) で求めることができる。
4. オプション：非特異および多特異を示す血清の **Average Positive** は、Positive 反応 (“ 4、6、8 ”) を示したウェルの Reaction code の平均値を計算することによって求められる。
5. 陽性検体なのか陰性検体なのかの判断に用いられる **Overall Reactivity Score (O.R.S.)** は、すべてのテストウェルの平均 OD 値を Positive control の平均 OD 値で割ることで求められる。この値 (Max = 1.0) を求めることで、%PRA の計算に用いた Positive カットオフ値とは独立して、血清の反応性を補正することができる。

#### G. LATM に関して

N = 2 の試験ウェルの平均 OD 値が、Positive カットオフ値を超えた場合 Positive と考えられます。実際の計算の流れは英文添付文書をご参照ください。

#### 8. その他

- ・ この製品は、IgG 抗体のみを検出し、抗 HLA 応答の初期段階に見られるとされる IgM は検出できません。なお、検出対象となる HLA 抗原パネルについては Worksheet をご参照ください。
- ・ %PRA 検査の位置付けは、最初のスクリーニングであって、これ単独で治療方針が決定されるものではありません。移植においては、最終的なクロスマッチテストが常に必要です。
- ・ 拒絶を抑えるための薬剤として用いられる Rabbit anti-globulin (ATG) の投与により、患者の血清に 100 µg/mL 以上の ATG が含まれている場合、非特異的バックグラウンドが高くなる場合があります。このようなケースでは、AP 結合 anti-human IgG 抗体を 10%ウサギ血清を含む Antibody Diluent で希釈するとバックグラウンドを抑えることができます。
- ・ %PRA (0-100%) は、HLA 抗原への感作の度合いを表します。頻回輸血や血小板輸血を受けた患者では、%PRA が高い値を示します。抗体の力価は時間の経過とともに低下していきます。また、従来の細胞毒性試験と感度を相関させるために 1:3 に希釈した血清を使用します。
- ・ 輸血歴のない健康な男性は、LAT アッセイにおいて PRA% は 0% となります。妊娠歴のある女性では、より高い %PRA を示したり、子供のパネル HLA に対し特異性を示すことがあります。
- ・ LAT は従来の細胞毒性試験と比べて 10 倍以上高感度で、LAT と LCT は非常によく相関していることが確認されています。
- ・ LAT は従来の細胞毒性試験とは異なるパラメータを測定している (すなわち LAT は IgG 特異抗体のみ、細胞毒性試験は補体活性と細胞毒性) ので、結果が一致するとは限りません。こういったケースでは LAT の結果の方が臨床的にはよりの確と言えます。

- ・ この製品は IgG 抗体を検出するようデザインされていますが、研究用途には AP 結合 Anti-IgA あるいは IgM 二次抗体と組み合わせることで IgA 抗体や IgM 抗体も検出することができます。
- ・ LATM における混合抗原の感度は、個々の抗原の感度よりも若干低くなります。そのため、LATM では血清の希釈率を下げて試験をすること、また、すべての“2”の反応は Positive の可能性を含んでいます。追って LAT で試験をすることで、反応の特異性を確認することができます。

## 9. 参考文献

1. Kissmeyer-Nielsen, F, Olsen, S, Peterson, VP, Fjeldborg, O. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 2: 662, 1966.
2. Zerbe, TR, Arena, VC, Kormos, RL, Griffith, BP, Hardesty, RL, Duquesnoy, RJ. Histocompatibility and other risk factors for histological rejection of human cardiac allografts during the first three months following transplantation. *Transplantation* 52: 485, 1991.
3. Katz, SM, Kimball, PM, Ozaki, C, Monsour, H., Clark, J, Cavazos, D, Kahan, BD, Wood, RP, Kerman, RH. Positive pretransplant crossmatches predict early graft loss in liver allograft recipients. *Transplantation* 57:616, 1994.
4. Karuppan, S, Lindholm, A, Moller, E. Pre- and post-transplant sensitization in cyclosporin A treated patients. *Clin. Transplant.* 2: 245, 1988.
5. Zhou, YZ, Cecka, JM. Sensitization in renal transplantation. In: Terasaki, PI, Cecka, JM, eds. *Clinical Transplants 1991*. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1992: 313.Sinnott,
6. PJ, Kippax, RI, Sheldon, S, Dyer, PA. A simple and rapid method for the detection of lymphocytotoxic antibodies using cell panels frozen on Terasaki plates. *Tissue Antigens* 26: 318, 1985.
7. Zmijewski, C. Detection and identification of HLA antibodies. In Zachary, A.A, Teresi, GA eds. *ASHI Laboratory Manual*, 2nd ed. Lenexa, KS, American Society of Histocompatibility and Immunogenetics, 1990.
8. Rodey, G, An approach to specificity analysis in high % PRA alloantisera. *ASHI Quarterly*, Spring: 18, 1993.
9. Welsh, KI, van Dam, M, Bewick, ME, Koffman, GK., Taub, DH, Raftery, MJ, Rigden, S. Successful transplantation of kidneys bearing previously mismatched A and B locus mismatched antigens. *Transpl. Int.* 1:190, 1988.
10. Kao, KJ, Scornik, J, Small, SJ. Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies: an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation* 55: 192, 1993.
11. Wang, G, Tarsitani, C, Takemura, S, Pei, R, Liu, AN, Lee, JH. ELISA detection of specific antibody to HLA class I antigens in transplant patients with panel reactive antibody (PRA) by a leukocyte antigen tray (LAT). In: *Proceedings of the 12th International Histocompatibility Conference*. *Human Immunol.* 47 (1-2): 133. 1996.
12. Cook, DJ, Terasaki, PI, Iwaki, Y, Terashita, GY, Lau, M. An approach to reducing early kidney transplant failure by flow cytometry crossmatching. *Clin. Transplant.* 1:252, 1987.
13. Karuppan, SS, Ohlman, S, Moller, E. The occurrence of cytotoxic and non-complement fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection episodes. *Transplantation* 54:839, 1992.
14. Chapman, JR, Taylor, C, Ting, A, Morris, PJ. Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches: relationship to renal transplant outcome. *Transplantation* 42:608, 1986.
15. Iwaki, Y, Lau, M, Terasaki, P. Successful transplantation across T warm-positive crossmatches due to IgM antibodies. *Clin. Transplant* 2: 81. 1988.
16. Rudy, T, Opelz, G. Dithiothreitol treatment of crossmatch sera in highly immunized transplant recipients. *Transplant Proc.* 19: 800, 1987.
17. Kerman, RH, Kimball, PM, Van Buren, CT, Lewis, RM, DeVera, V, Boghdahsarian, V, Heydari, A, Kahan, BD. AHG and DTE/AHG procedure identification of crossmatch-appropriate donor-recipient pairings that result in improved graft survival. *Transplantation* 51: 316, 1991.
18. Wang, G, Tarsitani, C, Takemura, S, Pei, R, Liu, AN, Lee, JH. ELISA assay for the detection of specific antibodies to Class I HLA antigens in transplant patients with panel reactive antibody. In: *Proceedings of the 22nd Annual ASHI Meeting*. *Human Immunol.* 49 (1): 109, 1996.
19. Harmer, AW, Sutton M, Bayne A, Vaughan RW, Welsh, KI. A highly sensitive, rapid screening method for the detection of antibodies directed against HLA class I and II antigens. *Transplant Int.* 6: 277, 1993.
20. Wang, G, Tarsitani, C, Denham, S, Chen, M, Lee, J-H. A new micro-Elisa for anti-Class I and Class II antibody detection. *Human Immunol.* 59 (1): 133, 1998.