

《使用上又は取扱い上の注意》

**2021年3月改訂(第6版) 下線部:今回改訂
*2018年7月改訂

1. 一般的注意

- ・ 本製品は研究用試薬です。疾病の治療、診断、予防を目的として使用しないで下さい。
- ・ 使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。
- ・ 試薬類を飲んだりなめたりしないで下さい。試薬が皮膚に付着したり、目や口に入らないよう、十分に注意して下さい。また、誤って皮膚に付着したり、目や口に入った場合は、直ちに水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、異常があれば医師に相談して下さい。

2. 使用者の危険防止に関する事項

(1) ウイルス、細菌

- ・ 細胞を調製する血液及び検体血清は、感染性があるものとして取り扱い、専用エリアで操作して下さい。
- ・ 陰性コントロール血清は、HbsAg、anti-HIV I&II、anti-HCV、STS、HIV-I RNA および HCV RNA に陰性であることが確かめられていますが、十分に気をつけてお取り扱い下さい。
- ・ 使用するピペットおよびチップは、各エリア専用として下さい。
- ・ エリア専用の作業着を着用し、使い捨てのプラスチック手袋を使用して下さい。
- ・ 作業終了後は実験台を 0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液(家庭用の塩素系漂白剤を 10 倍に希釈したもので拭いて下さい)。
- ・ 実験台等に血清が付着した場合は、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で拭いて下さい。

(2) 廃棄物に関する注意

血液、血清を扱ったものは、オートクレーブ後、廃棄して下さい。あるいは医療用廃棄物として廃棄して下さい。医療用廃棄物としての廃棄方法は、各実験施設の廃棄方法に従って下さい。

3. その他の注意

本製品は、改良のため予告なく仕様を変更することがありますのでご了承下さい。

《貯蔵方法》 《キットの構成》の項に記載

《有効期間》 12 ヶ月(使用期限は外箱に記載)

《包装単位》 48 テスト

《問い合わせ先》

湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部

〒739-1195 広島県安芸高田市甲田町下甲立 1624

TEL : (0826) 45-4625 FAX : (0826) 45-4624

受付時間 9:00~12:00、13:00~17:00 (月~金曜日、但し祝日を除く)

製造販売元
湧永製薬株式会社
広島県安芸高田市甲田町下甲立 1624
<http://www.wakunaga.co.jp/>

この説明文書をよく読んでから使用して下さい。
また必要な時に読めるように保管して下さい。

研究用試薬

WAKFlow HLA 抗体 クラス I & II (ICFA)

WAKFlow HLA 抗体 クラス I & II (ICFA) は、血液細胞上の HLA クラス I 及び II 抗原に対する抗体が血清中に存在するかどうかを確認するための研究用試薬です。本製品は、Luminex テクノロジー (xMAP®) を用いて検出を行うものです。

《測定原理》

HLA クラス I または II を発現している血液細胞と検体血清とを反応させます。検体血清中に血液細胞上の HLA に対する抗体が存在する場合は、HLA とその抗体との複合体が形成されます。その後、細胞を可溶化し、遊離した複合体をビーズ上の HLA に対する抗体で捕捉し、複合体に含まれる抗 HLA 抗体 (ヒト抗体) を標識抗体^(注)で検出します。

注) PE 標識 Goat anti human IgG

《キットの構成》

本製品の構成試薬および貯蔵方法は、以下のとおりです。

- ① ビーズミックス..... 0.5 mL × 1 本
- ② 10 倍濃度溶血試薬 9.6 mL × 2 本
- ③ 10 倍濃度洗浄液 I 10 mL × 1 本
- ④ 10 倍濃度洗浄液 II 30 mL × 1 本
- ⑤ 10 倍濃度 Lysis 液..... 1 mL × 1 本
- ⑥ 10 倍濃度 PBS 1 mL × 1 本
- ⑦ 標識抗体 50 µL × 1 本
- ⑧ 陰性コントロール血清 1 mL × 1 本

〔貯蔵方法〕

- ・ すべての試薬は 2~8℃で保存して下さい。
- ・ ①ビーズミックス、⑦標識抗体は、遮光して保存して下さい。

《必要な装置・器具》

本製品に必要な装置、器具および機材については、別冊の「**WAKFlow** HLA 抗体 クラス I & クラス II (ICFA) 操作説明書」をご覧ください。

《操作上の注意》

すべての操作は、できるだけ光が当たらないように注意して行って下さい。
検体ごとにチップを交換して下さい。

《操作方法》

1. 準備

(1) ビーズの処理

①**ビーズミックス**をボルテックスにより、しっかりと攪拌しておきます。

(2) 洗浄液の調製

- 1) ④**10 倍濃度洗浄液 II** に析出物がある場合は 37℃以下で加温して溶解し、析出物がなくなったことを確認します。
- 2) ②~⑥の各試薬は **10 倍濃度** となっていますので、**精製水で 10 倍に希釈**して使用します。希釈調製した各試薬は、2~8℃で保存し、**1 週間以内**に使用して下さい。

2. 操作手順

** (1) 検体の準備(全血を使用する場合)

- 1) 1.5 mL サンプルチューブに**溶血試薬:500 µL** を分注し、37°Cで 5 分間加熱した後、**EDTA、ACD あるいはヘパリン加血:500 µL** を添加します。ボルテックスにより攪拌した後、37°C恒温水槽で、10 分間インキュベートし、溶血反応を行います。
- 2) 2,000×g で 2 分間遠心分離を行います。
- 3) 溶血していない赤血球が沈殿し、2 層になりますので、上層のみを除去します。
- 4) 37°Cに加熱した**溶血試薬:1000 µL** を添加し、ボルテックスにより攪拌した後、37°C恒温水槽で 10 分間インキュベートし、再度溶血反応を行います。
- 5) 2,000×g で 2 分間遠心分離を行います。
- 6) 上清を除去します。
- 7) **洗浄液 I :500 µL** を添加します。ボルテックスにより白血球のペレットを再浮遊させた後、2,000×g で 2 分間遠心分離を行います。
- 8) 上清を除去します。
- 9) 7)～8)までの操作を再度行います。

※検体の準備(分離リンパ球を使用する場合)

分離したリンパ球を使用する場合、使用する分離試薬のプロトコールを参照して分離したリンパ球を使用します。細胞は $5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 個/検体となるように調製して使用して下さい。詳細な分離方法や細胞数については各施設にて設定して下さい。

** (2) 白血球の抗体感作および可溶化

- 1) 各チューブに **PBS:60 µL** を分注した後、ボルテックスにより白血球のペレットを再浮遊させます。
- 2) 該当する各チューブに**⑧陰性コントロール血清:20 µL** と**被検血清:20 µL** をそれぞれ分注します。
- 3) しっかりフタを閉め、ボルテックスにより攪拌した後、37°C恒温水層で 30 分間インキュベートします。
- 4) 各チューブに**洗浄液 II :500 µL** を添加します。2,000×g で 2 分間遠心分離を行います。
- 5) 上清を除去します。
- 6) 13)～14)までの操作をさらに 2 回、繰り返します。
- 7) 各チューブに **Lysis 液:50 µL** を添加します。しっかりフタを閉めた後、25°C、10 分間ミキサーを用いて攪拌し続けます。
- 8) **10,000×g** で **5 分間**遠心分離し、上清を得ます。

(3) 蛍光ビーズおよび標識抗体の反応

- 1) 96 穴 V 底プレートのサンプル数に応じた各ウエルに**①ビーズミックス:5 µL** を分注します。
- 2) (1)で得られた可溶化白血球の上清: 25 µL を添加します。しっかりシールをした後、遮光して、25°C、20 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。
- 3) 反応液が隣のウエルに混入しないよう注意しながら、慎重にシールをはがします。
- 4) 各ウエルに**洗浄液 II :200 µL** を添加し、2,000×g で 2 分間遠心分離を行います。
- 5) スナッピングにより上清を除去し、ペーパータオル等で余分な水分を良く吸い取ります。
- 6) ボルテックスにより蛍光ビーズを再浮遊させます。
- 7) 4)～6)の操作を再度行います。
- 8) 各ウエルに**⑦標識抗体を洗浄液 II** で 100 倍に希釈した**標識抗体:50 µL** を添加します。
- 9) しっかりシールをした後、遮光して 25°C、10 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。
- 10) 反応液が隣のウエルに混入しないよう注意しながら、慎重にシールをはがします。
- 11) 各ウエルに**洗浄液 II :200 µL** を添加し、2,000×g で 2 分間遠心分離を行います
- 12) スナッピングにより上清を除去し、ペーパータオル等で余分な水分を良く吸い取ります。
- 13) 各ウエルに**洗浄液 II :75 µL** を添加します。ビーズの塊が見える場合は、シールをしてボルテックスにより分散させて下さい。

(4) 測定

Luminex システムを用いて、ビーズミックスの Lot 番号に対応したプロトコールファイル或いはテンプレートファイルを使用して測定を行います。

*《測定結果の解析法》

測定結果を、専用の「**WAKFlow ICFA 解析ソフトウェア**」で解析します。本ソフトウェアでは、各ビーズの蛍光シグナルからインデックス値を算出し解析します。なお、ビーズミックスの Lot 番号に対応していないロットファイルでは正しく解析できませんのでご注意ください。

専用の「**WAKFlow ICFA 解析ソフトウェア**」は、試薬ご購入の際、無償にて提供いたします。

《性能》

1. 感度・正確性試験

特定の HLA 分子に反応性を持つ抗体を含んでいることが既知であるアロ血清と陰性コントロール血清および特定のパネル細胞を用いて操作手順に従い試験を行うとき、別途定めた式により算出したインデックス値が 2 以上を陽性、2 未満を陰性とした場合に、インデックス値により判定される各血清とパネル細胞との反応は、あらかじめ想定された結果と同一の結果が得られます。

2. 同時再現性試験

正確性試験を 3 回同時に行うとき、同一の結果が得られます。