

《使用上又は取扱い上の注意》

*2021年3月改訂（第2版）下線部：今回改訂
2018年8月作成（初版）

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ください。
- ・ 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- ・ 試薬を飲んだりなめたりしないでください。試薬が皮膚に付着したり、目や口に入らないよう、十分に注意してください。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、異常があれば医師の診療を受けてください。

この説明文書をよく読んでから使用してください。
また、必要時に読めるように保管してください。

2. 使用者の危険防止に関する事項

(1) ウイルス、細菌

- ・ 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ください。
- ・ 使用するピペットおよびチップは、各エリア専用としてください。
- ・ 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ください。
- ・ 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）で拭いてください。
- ・ 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ください。

(2) 廃棄物

血清を扱ったものは、オートクレーブ後、廃棄してください。あるいは医療用廃棄物として廃棄してください。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ください。

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ください。

- 《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》 25 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時～12時、13時～17時（土、日、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/>

研究用試薬

WAKFlow HLA 抗体 クラス I 抗体 特異性同定試薬

WAKFlow HLA 抗体 クラス I 抗体 特異性同定試薬は、血清中の HLA クラス I 抗原に対する 抗体(抗 HLA 抗体)を検出、識別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》

検体血清と精製 HLA クラス I 抗原が固定されたビーズミックスとを混合し、ビーズ上の HLA クラス I 抗原に検体血清中の抗 HLA 抗体を結合させます。次に、結合した抗 HLA 抗体を PE 標識抗ヒト IgG (Fc γ) で標識します。Luminex 装置にて各ビーズ上の PE 蛍光値を検出し、専用解析ソフトウェアを用いて抗 HLA 抗体の特異性を識別します。

《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625 μ L \times 1 本
- ② 10 倍濃度洗浄液 4 mL \times 1 本
- ③ 標識抗体 12.5 μ L \times 1 本
- * ④ 検体処理液.....125 μ L \times 1 本

[貯蔵方法]

- ・ すべての試薬は 2～8℃で保存してください。
- ・ ①ビーズミックス、③標識抗体は、遮光して保存してください。

《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 抗体/クラス II 抗体 特異性同定試薬 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ください。
検体ごとにチップを交換してください。

《操作方法》

1. 準備

(1) 検体血清の処理

検体血清を 10,000×g で 2 分間遠心分離を行い、不溶物を沈降させます。

(2) 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。

(3) 洗浄液の調製

1) ②**10 倍濃度洗浄液**に析出物がある場合は 37℃以下で加温し、析出物がなくなったことを確認します。

2) ②**10 倍濃度洗浄液**を精製水で 10 倍に希釈し、**洗浄液**を調製します。なお、操作後の残った洗浄液は、2～8℃で保存し、1 週間以内に使用してください。

2. 操作手順

* (1) 検体血清の処理

1) ④**検体処理液**を十分にボルテックスして、攪拌します。

2) 検体血清 45 μL と④**検体処理液:5 μL**を混和します。

※検体血清採取時は、チューブの壁や底に固着した沈殿物を取り込まないように注意して上清を取り、ウエルに入れてください。

3) 25℃、10 分間以上攪拌します。

※検体の処理後、壁面などに検体が多く付着している場合、状況に応じて遠心分離(フラッシュもしくは 1,300×g で 1 分間)を行ってください。

(2) ビーズと検体血清の反応

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:25 μL**を分注します。

* 2) ウエルに(1)**検体血清の処理で調製した検体血清:25 μL**を添加します。

3) 反応ウエルに隣のウエルの検体が混入しないように隙間なくしっかりシールをした後、遮光して 25℃、30 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。

4) 反応後、反応液が隣のウエルに混入しないように注意しながら、慎重にシールをはがします。

5) 各ウエルに**洗浄液:150 μL**を添加し、1,300×g で 2 分間遠心分離を行います。遠心分離の後、上清をスナッピングまたはアスピレーションにより除きます。

6) 各ウエルに**洗浄液:150 μL**を添加後、しっかりシールをし、ボルテックスによりよく攪拌した後、1,300×g で 2 分間遠心分離を行います。遠心分離の後、慎重にシールをはがし、上清をスナッピングまたはアスピレーションにより除きます。

7) 6)の操作を 2 度繰り返します。この遠心分離の間に③**標識抗体を洗浄液**で 100 倍に希釈しておきます。

8) 各ウエルに**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℃、30 分間プレートミキサーを用いて攪拌し続けます。

10) 反応後、慎重にシールをはがし、各ウエルに**洗浄液:150 μL**を添加後、1,300×g で 2 分間遠心分離を行います。遠心分離の後、上清をスナッピングまたはアスピレーションにより除きます。

11) 各ウエルに**洗浄液: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ください。

* (3) 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。

＜非特異反応を示す検体血清の場合＞

検体血清によっては、全てのビーズで蛍光シグナルが 1,000 を超える非特異的な反応を示す場合があります。その場合は、解析に支障をきたす恐れがあるため、検体血清と PBS を 1:1 で混合し、再検査をしてください。

《測定結果の解析法》

測定結果を専用の「**WAKFlow HLA 抗体解析ソフトウェア**」で解析します。検体血清の反応性は各 HLA 結合ビーズの蛍光値をブランクビーズ(BB)および標準陰性血清の測定値で補正した Calmed 値を用いて解析します。それぞれのビーズは Calmed 値に応じて 4 つの領域(スコア)に分類されます。抗 HLA 抗体の特異性が既知である複数のアロ血清を用いて陽性カットオフとするスコアをご確認ください。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 HLA 抗体解析ソフトウェア**」は、試薬ご購入の際、無償にてご提供いたします。

$$\text{Calmed} = (\text{Xpc} - \text{Xbb}) - (\text{Npc} - \text{Nbb}) * \frac{\text{Xbb}}{\text{Nbb}}$$

「Xpc」; 検体「X」の「ビーズ蛍光値」
「Xbb」; 検体「X」の「ブランクビーズ(BB)蛍光値」
「Npc」; 「陰性コントロール血清」の「ビーズ蛍光値」
「Nbb」; 「陰性コントロール血清」の「BB 蛍光値」

《性能》

感度、正確性および同時再現性

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標準血清およびモノクローナル抗体を用いて操作手順に従い試験を行うとき、各ビーズは規格内の蛍光値(Median)が得られます。この試験を 3 回同時に行うとき、同一の結果が得られます。