

11月25日(水)

● 質問1

-70°C以下で凍結融解すると、不純物を取り除かれるとのことですが、凍結した場合としていない場合でどのように結果に影響を与えるか、データはありますか？

● 回答1

凍結した場合としていない場合の比較データは残念ながらありません。

血清を凍結後、遠心して使用するプロトコールは、アメリカの Emory 大学病院 HLA Lab の Dr. Robert A Bray が推奨している方法です。

2011年に Dr. Bray が来日され、ベリタス講演会で紹介していただきました。

LABScreen、FlowPRA の検査のための血清の前処理として、凍結融解することで不純物を取り除くことが出来る有効な方法で Emory 大学では実施しているということでした。

『Patient serum (either fresh or frozen)...200 ul is needed for the test assay. If serum has not been frozen, freeze in a liquid nitrogen freezer for 15 minutes before airfuging the sample.』

South western 大学では-70°Cで、5分以上で凍結させ、その後遠心するという方法も紹介して頂きました。airfuging というのは、吸引しながら高速回転で遠心することで、100,000 gで15~20分遠心することです。

上記のように、血清の前処理に凍結融解と高回転の遠心は不純物を取り除くためには有効ということがわかっています。

検体を凍結する際は、必ず-70°C、15分で行う必要はございません。-20°Cでも構いません。採血当日に検査を行う場合は、-20°Cで凍結を行いますと凍結までに時間がかかりますので、-70°Cに15分程度入れて頂きますと凍結します、と紹介させていただいております。

● 質問2

ドライボルテックの回転数はどのくらいでしょうか？

● 回答2

ドライボルテックスの回転数は具体的な数値を表示できません。ドライボルテックの回転数が低いと洗浄効果が薄く、回転数が高過ぎるとビーズがはねてコンタミの原因となりますのでご注意ください。また、トレーを動かしながら行い、全ての検体が同じようにボルテックスされるようにしてください。

施設内で、ボルテックスの強さと時間を統一することにより、検査者による結果の差が小さくなります。ボルテックスによりコンタミが心配な場合はシールを貼ることをお勧めします。ボルテックス及びフリッキングの動画を web 掲載しておりますので、参照ください。

[HLA プロトコール ドライボルテックス](#)

[HLA プロトコール フリッキング](#)

### ● 質問 3

ドライボルテックスの後に Wash Buffer を入れてピペッティングすると説明がありましたが、ピペッティングをするのになぜドライボルテックスは必要なのですか？

### ● 回答 3

ドライボルテックスを行った場合は、Wash Buffer の添加後にピペッティングの必要はありません。ドライボルテックスを忘れた場合は、Wash Buffer 添加後ピペッティングしてください。なお、ドライボルテックスと比較してピペッティングは洗浄効果が低いため、メーカーではドライボルテックスを推奨しています。

11月28日（土）

### ● 質問 1

日本人フィルターは何を元に作成されていますか？

### ● 回答 1

組織適合性学会は毎年春に『HLA 推定アレル一覧表（JSHI）〇〇年度版』を発売します。

[日本組織適合性学会 HLA 標準化委員会 HP](#)

ベリタスでは、その報告に基づいて〇〇年度の日本人アレルフィルターを作成しております。記載されている全アレルを対象としておりますので、頻度が 0.001% のように低いアレルも日本人推定アレルとして表記されます。

組織適合性学会のその年度の QC ワークショップで使用できるようにベリタスは組織適合性学会がホームページで公開後、速やかにユーザーの方へアレルフィルターをお届けしております。

尚、日本人アレルフィルターはベリタス web からダウンロードできます。

[解析ソフト設定ファイル](#)

### ● 質問 3

HLA Fusion でデータをインポートする際に、NC 血清の値を Check Control で確認すると説明がありましたが、どの程度の解離であれば許容できますか？再検すべき基準などあれば教えてください。

● 回答3

残念ながら、Check Control をベースにした再検査基準の%や具体的数値での明確な基準はございません。

Check Control は、検査者の洗浄効果の指標にさせていただきたいです。ご自身がいつもどの程度の蛍光値がでるのか、複数の検査者がいる施設では蛍光値のばらつきを確認してください。

また、陰性コントロール血清は蛍光値が 550 以下の製品ですので、特定のビーズが 550 以上ある場合は、他の検体ウェルからのコンタミや陰性血清自体のコンタミが考えられます。

One Lambda の web に陰性コントロール血清のデータシートがあり、前のロットとの比較することが出来ます。

● 質問4

再検査基準を設定した場合、再検査基準を満たさない結果になったときは、どのようにアラートが出ますか？

● 回答4

Summary 画面の System Comment 欄にコメントが表示されます。

	System Comment	NC	PC	Min BeadCnt	PCNCRatio
①	NC Raw >=1500. Low PC/NC Ratio (< 2).	3000	8000	100	1.999
②	Low PC <500 (002=0).Low Bead Count(0).NC Bead has a Raw Value higher than all beads in the Sample. Low PC/NC Ratio (< 2).	6465	0	0	0
③	Low Bead Count(7).	500	10000	7	8.114

Summary 画面の System Comment 欄に基準値に満たない場合はコメントが表示されます。

① は NC が 1500 以上ありで、PC/NC が 2 以下であることを示しています。

② は PC が 500 未満であり、ビーズカウントが 50 未満で、PC/NC が 2 未満であることを示しています。

③ はビーズカウントが 50 未満で、最低のビーズカウント値が 7 であることを示しています。

なお、One Lambda 社は再検査基準を以下のように設定しています。

- 1) Negative control beads の Normalized MFI が 1500 以上
- 2) Positive control beads の Normalized MFI が 500 未満
- 3) PC/NC が 2 未満
- 4) ビーズカウントが 50 未満

● 質問5

繰り返しの凍結融解は行ってもよいでしょうか？再検査や特異性同定検査を翌日以降に実施する場合、再凍結と冷蔵保管のどちらを推奨されますでしょうか？

● 回答 5

測定対象である抗体（タンパク質）は-20℃以下の方が安定しています。検体（血清）は基本的に-20℃または-80℃に保管してください。翌日に再度測定するのであれば冷蔵保管で構いません。一度凍結した場合は、融解後は必ず遠心を行ってから使用してください。

● 質問 6

ベリタスチャンネルのユーチューブはどこからアクセスすればよいですか？

● 回答 6

下記サイトからアクセスしてください。

[ベリタスチャンネル](#)(YouTube サイトへ移動します)

また、ベリタス web の技術資料>資料動画からも見る事が出来ます。

[資料動画を探す](#)

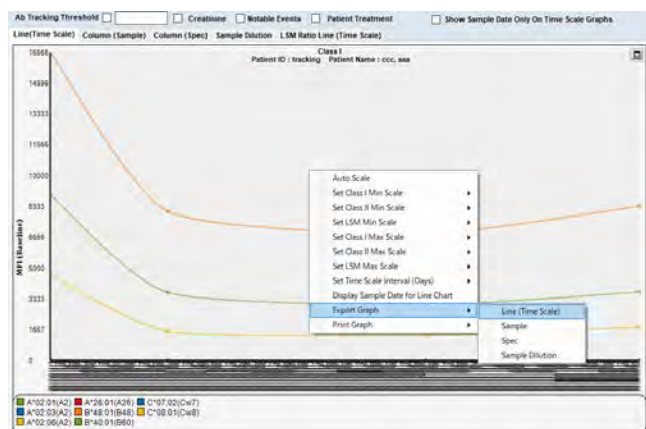
● 質問 7

HLAFusion の LABScreen Single Antigen の結果をもとに、nMFI の経時変化をグラフで確認できるようですが、PDF で保存はできますか？(電子カルテに掲載できたらいいなと思いました)

● 回答 7

グラフ上で右クリックし、Export Graph > Line (Time Scale) を選択しますと、jpeg ファイルで保存ができます。

LABScreen Single Antigen クラス 1、LABScreen Single Antigen クラス 2、LABScreen Mixed の3つのファイルが同時に保存されます。



- 質問 8

C1q アッセイでもエピトープ解析が可能でしょうか？

- 回答 8

C1q アッセイも通常の LABScreen Single Antigen と同様の方法でエピトープ解析をすることができます。

- 質問 9

エピトープ解析はタイピング結果が 4 桁、6 桁、8 桁と情報量が多いほど、解析結果の正確性はあがるのでしょうか？

- 回答 9

HLA 抗原のエピトープはアミノ酸の配列とその位置情報によって決定されます。

6 桁、8 桁が異なってもアミノ酸配列は同じですので、4 桁以上の情報を用いることで解析の精度があがることはありません。

エピトープはアミノ酸配列により決定されますので、エピトープ解析を行う場合は正確な 4 桁のタイピング情報が必要です。

下記の図は、今回のワークショップの MatchMaker の資料の 5 ページ目の図です。

	A	B	C	D	E
1	<b>Class I</b>				
2					
3	<b>Class</b>	<b>Epitope Name</b>	<b>Sero Group</b>	<b>AA Position</b>	<b>Polymorphic Residues</b>
4	I	1C		1	1C
5	I	16S		16	16S
6	I	17RS		14,17	R,S
7	I	17WR		14-17	14W17R(49E)
8	I	41T		41	41T
9	I	43RRM		43-44-45	43R44R45M
10	I	44KM <sub>3</sub>	44,45	{149,150,151,152}	{1'K,M (A,V,H,A) (V)}
11	I	44RM		44-45	44R45M
12	I	44RMA		44-45-46	44R45M46A
13	I	44RME		44-45-46	44R45M46E(67V)
14	I	44RT		44,45,46	R,T,E

AAPosition と書かれている部分は、各 Epitope のアミノ酸の位置です。

以上