

ワークショップ 6

検査の向上をめざして

ワークショップ 6 司会のことば

検査の向上をめざして

内川 誠(東京都赤十字血液センター)
佐藤進一郎(北海道赤十字血液センター)

医薬品としての輸血用血液製剤の安全性確保と事業効率化のため、血液センター検査部門は全国で10カ所に集約された。一方、集約した血液センターには十分に余裕のある人員を配置することで、世界の学問および技術の進歩を十分に検証し、必要であればすみやかにそれらを取り入れ、検査に反映できる体制作りが肝要である。こうした中、施設間差のない一定水準以上の検査結果の保証、通常の検査では解決困難な血液型検査、輸血副作用の原因究明など、さまざまな取り組みを行い、技術レベルの向上をめざしている。本ワークショップでは、より確かな検査結果を得るために日常検査での取り組みや問題点、また今後の方向性について五名の演者の方に発表していただいた。

検査集約に伴い血液型検査用自動検査機器がPK7300に統一されたことから、分析条件や試薬の基準などの見直しが行われ、同一基準での検査が可能となった。また、血液型関連試薬の多くは各血液センターで自家調製されていたが、メーカーに製造委託し、少ないロットで検査できる態勢が整いつつある。さらに、抗グロブリン法による不規則抗体検査や、二次検査の自動化に向けて検討されており、人的過誤の防止対策として期待される。

長い間、ABO亜型、RhD変異型の判定基準は、ポリクローナル抗体で行われてきた。現在では血液型判定用抗体の多くはモノクローナル抗体に取って代わり、ポリクローナル抗体との反応性の違いによる問題が生じている。ABO血液型判定の際、本来はB型であるB(A)型がAB亜型と判定されてしまう可能性がある。またABO亜型検査に用いられる吸着・解離試験にはモノクローナル抗体は不向きであることから、とくにBm型の特定には吸着・解離試験に取って代わる試薬や検査法の開発が必要である。一方、RhDに対するモノクローナル抗体は、各抗体クローナ間の特異性の違いをうまく活用することで、臨床的意義のあるパーシャルD

の検出と特定に有用である。

ABO血液型、Rh血液型など臨床的意義のある血液型のほとんどについては遺伝子構造が明らかにされており、DNAによる検査で血液型の判定が可能となった。B(A)型、weak DかD+あるいはweak DかD-の判断を迷う検体、パーシャルDの分類(とくにDVa)など、血清学的検査のみでは判定が困難な場合に、血清学的検査を補う手段としてDNA検査を導入することで、より正確で一定した結果が得られるであろう。また、医療機関に対する抗原陰性血液スクリーニングへのDNA検査導入の可否について、検査精度やコストなどさまざまな角度から検討していく必要があろう。

1990年7月に薬価収載されたPC-HLAは、これまで多くの患者の生命を救ってきた。それから20年が経過した2010年は、PC-HLA関連検査法が大幅に変更される節目の年となった。4月にHLA型検査はLCT法からDNAタイピング(Luminex system:SSO法)に変更され、12月にはHLA抗体検査法とリンパ球交差適合試験が現行のAHG-LCT法から、それぞれワークフロー HLA抗体 クラスI(MR)法、ICFA法に変更される。この全国的なHLA検査の標準化によって、HLA検査精度の向上や抗体検査の高感度化が期待され、今まで以上に有効なPC-HLAが供給されるようになると考えられる。なお、HPA抗体保有患者への適合血小板供給体制やHLA・HPA検査の技術協力の在り方は今後も継続的な検討が必要である。

非溶血性副作用の原因の多くは不明であり、それらの研究が進展することは極めて重要である。今回、輸血副作用の新しい検査法に関する報告があった。それらは好中球抗原(HNA)に対する抗体を検出する5 cell-lineage IFT法、Heparin-Binding Proteinを検出する好中球活性化試験、アレルギー性副作用を検出する好塩基球活性化試験である。実際の非溶血性検体を用いて前述の新検査法で測定した結果、副作用との関連性を示唆する興味あ

る所見が得られた。これらの検査法は他施設での追試も含めて検討し、その有用性を明らかにする必要性がある。

以上、いずれの演題の内容も血液センター検査の今後の方針や課題を明確に示したものであり、大変有益なワークショップであったと考えられた。また、本ワークショップは認定輸血検査技師の更

新講座としても開催されたため、医療機関関係者の多数の参加をいただいた。輸血医療を円滑かつ効率的に推進するためには、血液センターと医療機関の相互理解と協力が必要である。したがって、今回血液センターの実情を医療機関の関係者に熟知していただくよい機会であったと思われる。

ワークショップ 6

輸血用血液における血液型関連検査の向上

大橋 恒(北海道赤十字血液センター)

はじめに

2008年に自動血液型判定装置PK7300の分析条件は、より標準化した新しい分析メソッドに統一された。しかし、使用試薬の多くは濃度調整等が必要であり、とくに血球試薬の製造方法や管理方法は施設により異なる状況であった。また、用手法で実施される間接抗グロブリン試験や二次検査の自動化も課題であった。このような背景を踏まえ、試薬の統一化と不規則抗体検査の自動化に向けた取り組みを報告する。

1. 血液型関連検査試薬の統一化

試薬製造体制の見直しにより、試薬製造センターで製造している抗D試薬等は市販品を購入し、各血液センターで調製している血球試薬等は試薬メーカーに製造と供給を委託することが決定した。その後、共同開発契約が締結され、メーカーが製造した試作品についての評価を実施してきた。

PK7300用試薬である抗D、血球陰性コントロール、抗Aおよび抗B(原液、希釈)、A型およびB型血球、O型血球(食塩液法用、酵素法用)、プロメリン溶液の11試薬を対象に献血者検体を用いて現行試薬との並行検査を実施した。その結果、一致率は99.4~100%と高く、一次検査保留率もほぼ同等な結果を示した。また、ABO血液型およびRh(D)血液型の誤判定は認められず、既知のABO亜型(30例)や不規則抗体陽性検体(38例)も同等の結果を示した。しかし、既知partial D(26例)は、Category DVIを含む5例を双方で検出したが、試作品では検出できないDIVbやDVa等の14例と現行試薬では検出できないDFRとDCSの3例が不一致となった。このため、抗D試薬の変更の際は、partial Dの検出を考慮し、まれな血液型とともに新規献血者の血液型スクリーニングとして実施することが検討されている。その他、安定性や溶血の有無、品質試験基準への適合等の評価試験や二次検査用プロメリン試薬、抗ヒトグロブリン抗体

試薬の評価も実施したが、何れも現行試薬と同等の性能を有していることが確認された。2010年5月にはPK7300専用試薬として血球試薬4種類とプロメリン試薬が一部センターに先行導入された。分析メソッドおよび試薬の統一化前後における施設別の一次検査保留率は、統一前では施設間差が大きく、とくに不規則抗体検査では2%を超える施設を認めたが、統一試薬が導入された6施設では、保留率は何れも低くなり、施設間差も是正され、標準化が図られていることが示唆された(図1)。

2. 不規則抗体(間接抗グロブリン試験)の自動化

全自动輸血検査装置IH-1000(ゲルカラム法)を用いた間接抗グロブリン試験は、従来法の10プール試験管法と同等な感度を示した5プールカラム法で評価を実施した。特異抗体8例(抗D, E, M, S, Fy^b, Di^a, Jk^a, Jr^a)を連続希釈して作製した検体のプール検体を検査し、検出感度を比較した結果、従来法よりIH-1000のほうが低い抗体価(1管差)を示したのは抗Jr^aのみで、他の7例では何れも同等以上の抗体価を示した。また、PEG添加間接抗グロブリン法が陽性の特異抗体89例に対する検出率は、IH-1000が81% (72例)、従来法が64% (57例)であり、IH-1000のほうが高かった。献血者検体10,263例による並行検査の一一致率は99.98%で、不一致はIH-1000のみ陽性の抗Eと試験管法のみ陽性の抗Jr^aの各1例であった。また、IH-1000では判定保留(?)が26例(1.3%)認められ、個別検査で1例が陽性(抗Xg^a)と特定された(表1)。しかし、(?)判定は目視で確認したところ、すべて陰性であり、これらを陰性として扱うことが妥当と考えられた。

まとめ

メーカーで製造された試薬は、現行試薬と同等の性能を有していることが確認され、試薬の統一化によって、施設間差の是正など、検査の標準化

が図られた。また、IH-1000による間接抗グロブリン試験の自動化は、効率化と人的過誤の防止に有用である。さらに、IH-1000はABO血液型および

Rh(D)血液型の二次検査の自動化への応用も期待される。

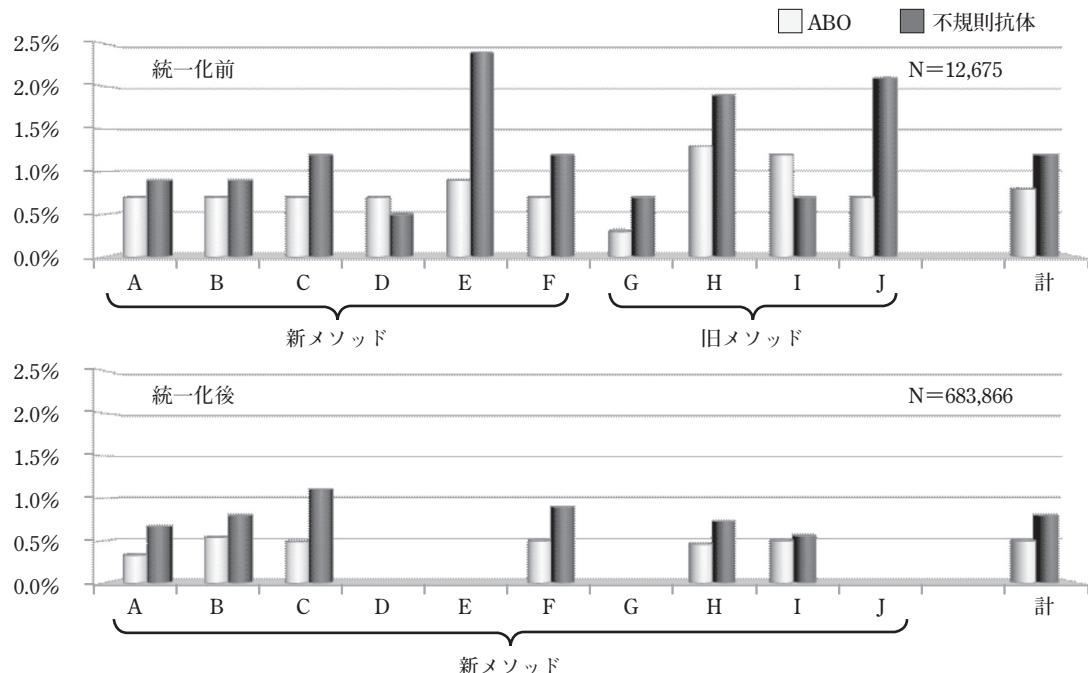


図1 施設別の一次検査保留率

表1 5プールカラム法と10プール試験管法の並行試験

N=10,263

5プールカラム法(IH-1000)

検査数	プール検体		個別検体 陽性数
	検査結果	陽性数	
2,061	(-)	2,032	0
	(?)	26	1
	(1+)	2	2
	(2+)	1	1

10プール試験管法

検査数	プール検体		個別検体 陽性数
	検査結果	陽性数	
1,037	(-)	1,033	0
	(w+)	2	2
	(1+)	2	2

10プール試験管法	
+	-
3	1
1	10,258

陽性検体の内訳

No.	5プールカラム法 (IH-1000)	10プール試験管法	特異性	カラム法(IH-1000)		試験管法	
				個別	5プール	個別	10プール
1	+	+	E	1+	1+	1+	1+
2	+	+	Di ^a	1+	2+	1+	1+
3	+	+	Xg ^a	1+	?	1+	w+
4	+	-	E	2+	2+	0	0
5	-	+	Jr ^a	1+	0	w+	w+

ワークショップ 6

血液型判定における遺伝子検査の適用

内川 誠(東京都赤十字血液センター)

特異抗体を用いた赤血球凝集反応は、表現型つまり血液型抗原の有無を検査する際のほぼ唯一の手段である。赤血球凝集反応による血液型判定は、低コストで手技も比較的簡単であり、感度、特異性の面からもほぼ満足いくものであるが、主観的な判断を伴うこと、特異抗体の不足、品質のばらつきなど、限界もある。また、血液型判定用試薬としてモノクローナル抗体が導入されてから約20年経過し、モノクローナル抗体の特質に由来する血清学的な問題も指摘されている。たとえば、ABO血液型のB(A)型はB型と判定されるべきであるが、モノクローナル抗Aとの反応からAB亜型と判定されてしまう場合がある。さらに、RhD変異型であるweak D, partial Dを血清学的検査のみで正しく判定することが困難な例も多い。一方、これら変異型の遺伝子情報は蓄積されつつあり、DNA検査は血液型判定にきわめて有用な手段となっている。我が国では、血液センターが血液型検査の専門機関として機能し、その責務を果たしてきた。輸血用血液についての血液型の正確な判定のみならず、複雑な血清学的問題を解決できる技術レベルを向上させるため、血清学的検査に加えてDNA検査による情報を有効に取り入れることが必要不可欠である。DNA検査による遺伝子型から表現型を予測できるようになったため、抗原陰性血液のスクリーニング、不規則抗体同定用パネル血球の抗原構成の充実、血清学的検査では判定できない直接抗グロブリン試験が陽性の検体や輸血された赤血球が混在する患者検体の血液型判定など、輸血の安全性向上に寄与することが期待される。ここではB(A)型、RhD変異型への適用、さらに臨床的に重要な血液型抗原についてPCR-SSPによる遺伝子型と特異抗体を用いた赤血球凝集反応による表現型を比較検討した結果を述べる。

B(A)型への適用

B(A)型はマウス由来モノクローナル抗Aとのみ

微弱な凝集がみられ、ヒト由来ポリクローナル抗AやB型の人がもつ抗Aとは、吸着・解離試験でも陰性となる。市販のABO血液型判定用ヒト由来ポリクローナル抗体が入手困難な状況にあり、B(A)型はAB亜型と判定される恐れがある。B(A)型の原因遺伝子は、欧米人や中国人ではB遺伝子の変異型として報告されている。一方、日本人では今のところA遺伝子の変異型としてのみ検出され、2種類の変異型A110とR102が知られている。O型と判定した検体2,000例からA110とR102それぞれ1例ずつ2例を検出した。この2例の赤血球についてA抗原の有無を吸着・解離試験等を用いて精査したが、A抗原は検出されなかった。機序については不明であるが、A110またはR102はB遺伝子と一緒に持つ場合のみマウス由来モノクローナル抗Aと弱い凝集がみられるようになる。B(A)型をAB亜型と判定してしまうと、A110/OまたはR102/OはO型としか判定されないため、家系調査などでO型とB型の両親からAB型が生まれるといった問題が生じる場合がある。B(A)型赤血球にはヒト抗Aと反応するA抗原がまったく認められることから、患者および輸血用血液のどちらであってもB型として扱うべきである。血清学的検査でB(A)型が疑われた検体については、DNA検査によってA110およびR102についても確認する必要があろう。

RhD変異型への適用

抗Dを用いて検査した際、RhD表現型の判定が困難な場合がある。これには以下に挙げるいくつかの要因が考えられる。1) RhD抗原には複数の立体的抗原性をもつエピトープが存在する。アミノ酸置換を伴うRHD変異型では、RhD抗原の発現レベルとRhD抗原のエピトープとともに変化がみられる。2) さまざまな方法でRhD抗原の検査が行われている。たとえば、試験管法、スライド法、ゲルカラム法、固相法などである。用いる検査法の違いによって、RHD変異型赤血球の凝集の有無や強

弱の判定結果が異なる場合も多い。3) 市販されている抗D試薬は、メーカーごとに異なるクローンに由来するモノクローナル抗Dを使用しているため、RHD変異型赤血球はメーカーごとに異なった反応性を示す。

weak DとD+の鑑別、さらにweak DとD-の鑑別など、凝集反応では判定が困難な検体については、DNAによるRHD遺伝子変異を確認することで、抗Dによる血清学的検査に伴う諸問題を解決できるであろう。また、partial Dの分類は臨床的意義を判断する上で重要であるが、血清学的検査のみでは分類が困難な検体(とくにVa)も多いことから、DNAによる追加検査は、きわめて有用である。

DNA検査(PCR-SSP)による遺伝子型と 赤血球凝集反応による表現型の比較検討

ランダムに選択した検体1,000例について、主な

血液型抗原14種類のDNAによる遺伝子型と赤血球凝集反応による表現型を比較検討した。不一致が認められた場合、再度確認ができるよう赤血球検体は保管しておいた。対象とした血液型抗原は以下の通りである。Rh(C, c, E, e), Kidd(Jk^a, Jk^b), Duffy(Fy^a, Fy^b), MNS(M, N, S, s), Diego(Di^a, Di^b)。遺伝子型が陽性で表現型が陰性の不一致例が3検体にみられた。その内訳はRheが1例、Jk^bが2例であった。これ以外の血液型抗原はすべて、100%の一一致率であった。より信頼できる結果を得るために、さらに検体数を増やし不一致例の解析を進めなければならない。また、多数検体を対象とした抗原陰性血や「まれな血液型」スクリーニング検査への適用も視野に入れて、精度、コスト、設備など多面的に検討していく必要がある。

ワークショップ 6

ABO血液型、D抗原判定上の問題点

菊地正輝(宮城県赤十字血液センター)

【はじめに】

大戦によって米・英などの諸国に輸血事業の著しい進展があり、多数のヒト血液を日常検査の対象として扱うようになり、ヒトから大量の血清を採取したり、抗体を産生させる目的でヒトで免疫したりすることが比較的抵抗なしに行われた。(安田純一著より引用)このような背景をもとに、ヒト由来ポリクローナルの血液型判定用血清が輸入販売され、使用されてきた。また、日本の血液型の研究成果に基づいて製品化された動物免疫血清もポリクローナル抗血清と共に使用されてきた。昭和の終わりから平成の初めにかけてモノクローナル判定用抗体が市販され、現在モノクローナル抗体への移行が進んでいる。試薬の由来により反応性がわずかに異なることより、献血者の検査を通じてモノクローナル判定用抗体の問題点、メリットについて、ABO血液型判定に関してはB(A)との反応性、B_m型との吸着・解離試験、Polyagglutinationについて、D抗原検査については非特異的反応、Partial Dについて述べると共に、現在の知見についても言及する。

【検査対象】

検査対象は、東北6県の献血者血液の検査を宮城県赤十字血液センターで開始した2008年8月～2010年3月の献血者血液とした。検査数は、延べ652,311例、実人数(各赤十字血液センターの実人数の合計)で332,002人である。

【ABO血液型検査における問題点

—その1 B(A)—

B(A)は、ヒト由来抗Aとは反応せず、モノクローナル抗A、動物免疫抗Aときわめて弱く凝集し、凝集塊は細かく、脆い反応である。血清中の抗Aは正常かやや弱く、A型転移酵素は検出されず、分泌型唾液中にはBとHの型物質が存在するが、A型物質は検出されない。ヒト由来抗A血清による

吸着・解離試験では、抗Aは解離されない。したがって、臨床上はB型として扱われる。

血液センターでは、ABO血液型判定をマイクロプレートを用いた静置法での自動輸血検査機器PK7300で検査を行っている。うら試験の抗Aが弱いため精査を実施した中から、実人数で約7,500人に1人の割合でB(A)が検出された。

B(A)は、高いB型転移酵素活性の存在、いくつかの特有の遺伝子によって生じることが知られている。当施設で検出した27例のB(A)について検討したところ、遺伝子型がB/BとB/Oが約50%であり、血清を酵素源としてO型血球をB型に転換後、B抗原量をFCMで平均蛍光強度を比較して転移酵素活性を測定したところ、通常のB型血清より高い酵素活性であった。残る検体からは、R102遺伝子が多く検出された。

B(A)とA_xBは抗A判定用試薬との反応性が類似しているが、ヒト由来抗A血清との吸着・解離試験によって判別が可能である。しかし、ヒト由来ABO血液型判定用血清が入手できないことを考え合わせると、今後は遺伝子検査も加味して判定していく必要があると考える。

【ABO血液型検査における問題点

—その2 B_m型、AB_m型の吸着・解離試験—

B_m型、AB_m型は、日本人に多く検出されるvariantである。実献血者で、B_m型が39人、AB_m型は15人検出され、全献血者の8,500人に1人がB_m型であり、22,000に1人がAB_m型であった。B型におけるB_m型の割合は2,000人に1人であり、AB_m型も同様に2,000人に1人の割合で検出された。

モノクローナル抗体による吸着・解離試験の最適な条件を見出し、B_m型血球とAB_m型血球の吸着・解離試験を行ったところ、B_m型血球においては、ヒト由来判定用血清と比較してかなり弱いが各社の判定用抗体で抗体が解離された。しかし、AB_m型血球においては、解離液中の抗体が非常に弱い

か陰性であり、市販ヒト由来血清の強陽性とは著しく異なっている。したがって、モノクローナルABO血液型判定用抗体を用いて吸着・解離試験を行なうことは困難であり、現在我々は献血者の血液から高力価の抗Bを検索し、吸着・解離試験用試薬として使用している。

第15回の本学会総会において、矢部らがO型献血者の血清が200人に1人の割合でB_m型血球と反応することを報告した。また、16~32倍のマユミ抗Bレクチンが34例中25例のB_m型血球を、AB_m型血球は14例中6例が凝集した。したがって、B_m型血球は通常のB抗原性とは異なる可能性があり、さらに研究を進めることにより、モノクローナル抗体とヒト由来血清との反応性の相異の一部を補完できる可能性が示唆されている。

【ABO血液型検査における問題点

—その3 Polyagglutination—

Polyagglutinationを生じている患者に新鮮凍結血漿の投与による重篤な輸血副作用症例が報告されている。Polyagglutinationの発見の糸口は、モノクローナルABO血液型判定用抗体の発売前の1987年までは、「ABO血液型検査」(ABO抗原の減弱およびPolyagglutinationの抗原との反応)の割合は、「ABO血液型検査」、「交差適合試験不適」、「溶血性輸血副作用」の合計の45%であったが、1988年以降は21%に減少している。この原因として、ヒト由来ABO血液型判定用血清とは異なり、モノクローナル抗体はPolyagglutinationが生じた血球と反応しないことも一因となっている。大多数の施設で、血小板濃厚液、新鮮凍結血漿の輸血時に、副試験、Polyagglutinationを検出するための検査が行われていない。モノクローナルABO血液型判定用抗体の使用により、ABO血液型検査時にPolyagglutinationが検出されにくくなっている。重症細菌感染症患者への新鮮凍結血漿、血小板濃厚液の輸血による副作用を防止するため、検査時、血液製剤払い出し時に患者情報の入手がより重要性を増している。

【D抗原の精査内訳】

モノクローナル抗D「日赤」を用いて652,311例の検査を行い、6,165例が陰性と判定され、ポリクローナル抗Dを加えて確認検査を実施した。その結果、抗Dとの反応が弱い例、ポリクローナル血清

とモノクローナル抗体との反応が不一致例を精査し、weak D 89例、Partial D 23例が検出された。残る5,888例はD抗原陰性と判定したが、その約8%がポリクローナル抗Dに非特異的と考えられる反応が確認された。weak Dの実人数は26人で約13,000人に1人の割合であった。

【D抗原検査における問題点

—その1 非特異的反応—

非特異的な反応と考えられる例は、確認検査に使用しているO社のポリクローナル抗Dとモノクローナル「日赤」抗Dに即時遠心判定では共に陰性であるが、抗グロブリン法においてポリクローナル抗D血清のみが弱陽性を示す。なお、I社のポリクローナル抗D血清とは陰性である。この非特異的と考えられた186例についてC抗原を調べたところ、38%がC抗原陽性であり、D抗原陰性者でのC抗原陽性率の約20%より高い割合であった。なお、非特異的反応の原因は解明されていない。現在市販されているポリクローナル抗Dを使用して確認検査を実施する場合、偽陽性反応を生じる場合があり、注意が必要である。

【D抗原検査における問題点

—その2 Partial D—

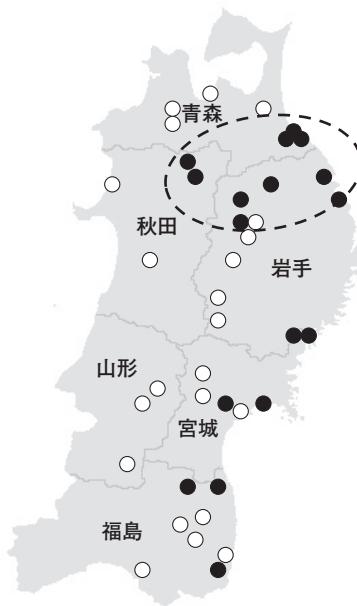
Partial Dは、延べ652,311例から23例、実人数では332,002人から18人検出され、実人数で約18,500人に1人の割合で検出された。partial Dの献血者の居住地を調べると、日本海側には検出されず、青森、岩手、秋田の県境付近にとくに多く検出されている。Categoryは、IVbが1人、Vaが16人、VIが1人であり、約9割がVaであった。一方、国内において抗Dを產生したD抗原陽性者例の報告でCategoryが判明している例は、IVが2人、VIが2人、New Typeが1人である。各社の抗D血液型判定用抗体の特異性は、Category VIと陰性を示す製品が多いが、Category IVとはすべて陽性であり(各社からの情報による)、Category IVの患者はD陽性と判定され、D陽性血液の輸血や妊娠により抗Dを產生される可能性がある。モノクローナル抗体の特性を生かすためにもCategory IVとVIが検出できる判定用試薬への変更が望まれる。

【まとめ】

ポリクローナルからモノクローナル判定用抗体

への変更により、安定的に、ロット間差の少ない試薬が入手可能となった。また、モノクローナル抗D判定用抗体への移行により、部分抗原の欠損を検出することができ、Partial Dの患者が輸血に

より抗Dの産生を一部防止できるメリットがある。しかし、ABO血液型の判定においては、ポリクローナル判定用抗体との反応性の相違点があり、補完するための方法を模索していく必要がある。



検出県	●PD*	○WD**
青森	1/12,213	1/8,142
秋田	1/21,118	1/21,118
岩手	1/9,624	1/6,874
宮城	1/18,193	1/36,386
山形	0/39,605	1/13,202
福島	1/26,807	1/13,404
東北地区	1/18,445	1/12,769

*PD : partial D **WD : weak D

図1 partial D, weak D献血者の居住地

ワークショップ 6

HLAとHPA

永吉裕二(日本赤十字社九州血液センター)

概要

血液センターにおいてのHLA関連の研究は1970年代前半には主だったセンターで始められていた。当初、女性献血者の血清をスクリーニングして優れたHLAの抗血清が集められ1970年代後半には、先駆者の技術開発、指導のもと、全国的にHLAクラスI抗原に関しての検査システムが構築された。

この当時、既にアメリカおよびヨーロッパでは、“HLA適合血小板”(以下PC-HLA)の概念が確立され、血小板輸血無効症例患者への対応がなされていた。その後、我が国の先行の血液センターにおいても、医療機関の理解・協力を得て、アフェレーシス献血導入の相乗効果も含め“PC-HLA”の臨床的意義・有効性を検証した結果、1990年7月には薬価収載の運びとなった。

PC-HLAの供給体制は、HLA検査関連の技術力は勿論であるが、ドナー確保・採血・供給システムの構築等、赤十字の組織力が成した業である。この実績・信用が、今日の骨髄バンク・さい帯血バンク等への参画および技術協力等に繋がっているといえる。

PC-HLAは薬価収載されて20年。近年5年間の血小板の供給本数は全国的には増加傾向にあり、2009年度は全国で約750,000本が供給され、内PC-HLAは約18,000本が供給されている。血小板供給本数に占めるPC-HLAの比率はここ数年、全体で2.3%前後を、推移しているが、ブロック別では比率に大きな差が認められ、北海道ブロックは5年間の平均が4.2%。逆に福岡ブロック0.9%と低い比率である。この差は、以前より確認されているが要因の確定には至っていない。福岡ブロックでは、検査・製造部門を集約した2008年度のPC-HLA供給本数は前年度比140%強の集約効果による増加が見られ、比率も若干上昇した。しかし、依然PC-HLA供給本数の少ない地域といえる。(図1・2)

今回、PC-HLAおよび技術協力に係るHLA・HPA関連検査法の現状と今後の展望について述べる。

1. HLA・HPAタイピングについて

PC-HLAドナーのタイピングは、これまで血清学的検査であるLCT法で行ってきたが、平成22年4月より遺伝子検査に変更した。方法は、PCR-rSSOP法を採用し、試薬、手順、機器等は統一した運用で実施している。遺伝子レベルで行うことによって、これまでタイピング困難であった症例の軽減を含め、格段の精度向上が期待できる。

HPAタイピングについても、現在必須ではないが、当センターでは同じ検査方法を採用している。また、当センターでは、依頼検査としてのHLAタイピングの確認等に、直接に塩基配列情報を収集してアリルを特定するSBT法も導入している。

PCR-rSSOP法の測定原理は、標識プライマーを用いて、目的の遺伝子領域をPCR法で増幅させ、蛍光色素を練りこんだビーズ上のプローブとハイブリダイズさせる。ビオチンで標識された増幅DNAに蛍光標識ストレプトアビシンを結合させ後に、Luminex装置を用いビーズ上の蛍光とビーズの種類を同時に検出・識別させる方法である。それぞれのプローブが付いたビーズの種類を判定することで遺伝子型を決定できる。ここで使用する、専用のLuminexビーズは、直径 $5.6\mu\text{m}$ のポリスチレン製マイクロビーズで二種類の蛍光色素で10段階ずつ濃度を変え100種類に色分けされている。どのプローブが付いたビーズなのかを識別させる方法である。

SBT法はDNAのA・T・G・Cから成る塩基配列を、直接決定する精度を高めた検査方法である。

遺伝子タイピングは優れた検査ではあるが、不純物の混入がPCRに影響を及ぼすと言われ、如何に純度の高い、安定した濃度のDNAを抽出するかが検査精度を高める鍵となること、DNAの増幅操作が結果に多大な影響を及ぼすこと、そしてタイピングにはさまざまな要因で判定困難例が存在すること等を熟知している必要がある。とくに幹細

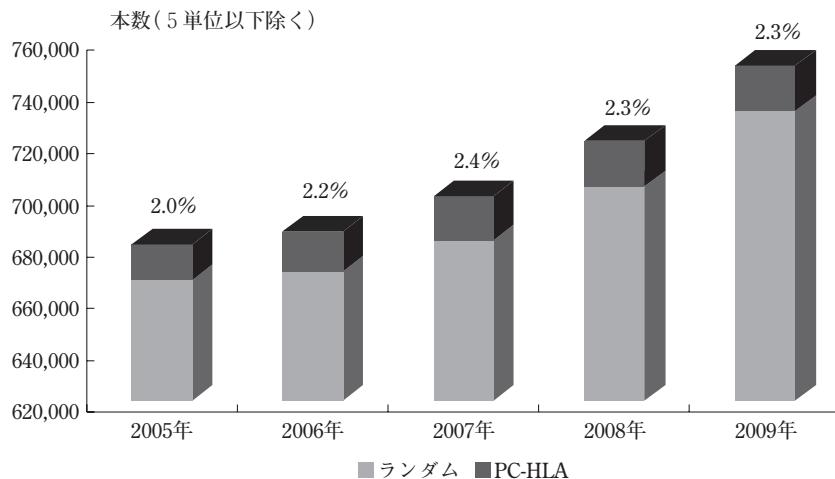


図1 年度別血小板供給本数(全国)

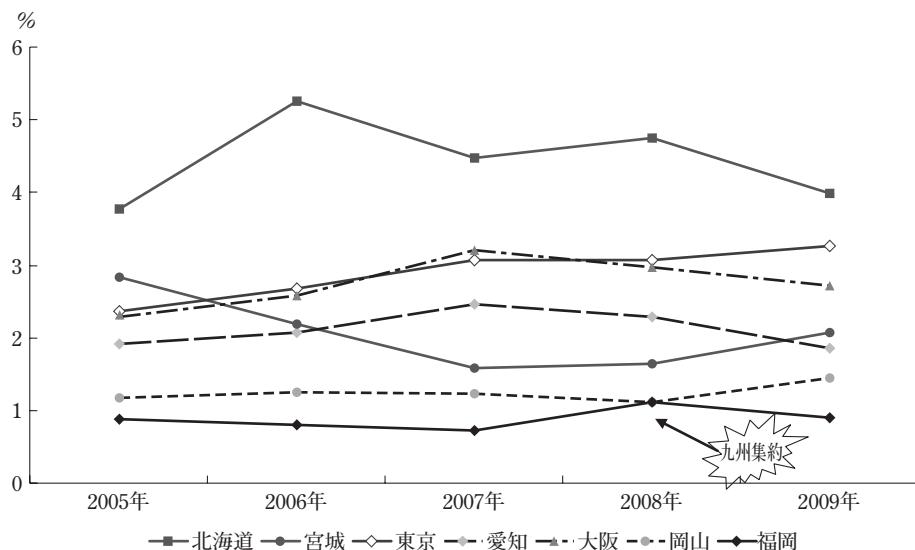


図2 ブロック別PC-HLA供給比率

胞移植後の検体によるキメリズム、新規のアリル、LOH(loss of heterozygosity)等についても基礎知識として習得していなければならない。LOHは、染色体中の遺伝子がさまざまな理由で再編成や変異が生じ遺伝子構造が保てなくなり、ヘテロ接合体を喪失するがある現象で、がん疾患では比較的多く見られる。近年、治療のひとつとして、同

種造血幹細胞移植を行うケースが増えてきている中、HLAタイピング検査を行う場合、的確な判定ができる解釈能力が必要である。また、複数のアリルの組み合わせが存在してしまう結果となることがあり、新しいアリルやまれなアリルに限らず、試薬やタイピング法によっては、区別できないことが日常的に起こり得ることから、アリル頻度、

ハプロタイプの知識を熟知し、使用したタイピング法(タイピングキット)での検出限界も知っておくことが重要となる。

2. 抗体検査について

現在、主流のHLA抗体検査試薬は、精製HLA抗原をマイクロビーズに固定した検出試薬(FlowPRAおよびLABScreen)である。(表1)

前者はフローサイトメータで、後者はLuminex装置を用いた方法である。原理はどちらも間接蛍光抗体法の応用であり、マイクロビーズに固定されたHLA抗原に被検血清中のHLA抗体を反応させ、蛍光標識した二次抗体で検出する方法である。これらの検査は、抗体検出だけでなく、精度の高い特異性までの解析を可能としている。また赤十字がメーカーと共同開発した、画期的な方法であるICFA法は、患者血清と直接ドナー全血と反応させ抗原抗体複合体を検出させる方法で、これもLuminex装置を利用する方法である。今後血液センターでは、PC-HLAの交差適合試験に、このICFA法を採用する予定であり、臓器移植等の抗体検査、クロスマッチにも有用な方法と期待されて

いる。

HPA抗体を主にターゲットにした、検査には、MPHA、MAIPA、ELISA法等があるがHPA抗体の検出も蛍光ビーズ法が市販されている。抗体検査は誰が実施しても同一で確実な結果を得ることが理想であるが、なかなかそうはいかないのが現状である。そこに求められるのは、検出テクニックの同一性だが、現在の抗体検出手法は多種多様で、検出感度や原理方法によって結果に差が生じる。また、輸血や移植といった検出目的によっても結果の解釈は異なる。とくにHLA抗体の検出には、操作上のテクニックと、結果を解釈するための知識と応用力が求められる。

操作上では、主に扱うサンプルに由来する非特異反応や高感度化に伴うHLA抗体以外の反応等の問題への対応。一方、HLA抗原は対立遺伝子型そのものであり、他の血液型のように一つ一つのアロ特異性に抗原名が規定されていないこと等からHLA抗体から見ると共通のアミノ酸置換は、複数のHLA抗原のみならず複数のローカスに渡って認められる場合もあり、それぞれが抗原グループを形成している。その抗体特異性を表現するには、

表1 主なHLA・HPA抗体検出方法

方 法	目 的	品 名
LCT(CDC-XM)	Specificクロスマッチ	
AHG-LCT(CDC-XM)	Specificクロスマッチ	
LIFT(FC-XM)	Specificクロスマッチ	
MAILA(Antigen Capture ELISA)	Specificクロスマッチ	
ICFA(蛍光マイクロビーズ)	Specificクロスマッチ Screening(Mixed)	WAKFlow HLA抗体クラスⅠ・Ⅱ(ICFA)
ELISA(精製抗原)	Specific(LAT) Single Antigen	Lambda Antigen Tray
蛍光マイクロビーズ(精製抗原) FCM	Screening Specific Single Antigen	FlowPRA
蛍光マイクロビーズ(精製抗原) Luminex	Screening(Mixed) Specific(PRA) Single Antigen	LABScreen
蛍光マイクロビーズ(精製抗原) Luminex	Screening Screening	WAKFlow HLA抗体クラスⅠ・Ⅱ(MR)
ELISA(糖タンパク)	Specific クロスマッチ	Ab Screen HLA MICROAMS
ELISA(糖タンパク)	Screening(HPA)	PAKPLUS
MPHA血小板抽出抗原	Screening(HPA) Specific(HPA)	anti-PLT・オリビオ・MPHAⅡ anti-HPA/MPHAパネル
MAIPA	Specific(HPA)	

抗原名としては同一であるが、実際に反応するエピトープ(抗原決定基)は異なる等、HLAシステムの特殊性およびエピトープからみた抗体特異性の解釈、さらには抗体がどのようなエピトープに向かっている抗体であるかを考え、明確にならない症例では、どの抗原とは反応しないかの視点にてPC-HLAドナー選択で採用している許容抗原という考え方で解析し、移植等のドナー選択を考慮するといった、結果を解釈するための知識と応用力が必要である。

3. 今後の展望

血液センターでは、PC-HLA製品に関連する検査については、感度を上げた検査方法に変更を進めている。このことにより、より精度の高い、効果の優れたPC-HLA製品を目指している。このことは、医療機関側の関係者に、輸血効果情報の提出等の協力を得ながら進めていかなければならない。また同時に献血者の協力によるドナー登録の増加に努めなければならない。

先に、述べたように、HLA・HPA関連の検査に

ついては、その結果の分析は輸血・移植関連に重要な要素を含んでいる。臨床効果と抗体の関係について更なるデータの収集と研究が必要である。

血液事業におけるこの分野の技術協力についてはさまざまな意見があとこであるが、九州ブロックでは検査業務を集約するにあたり、それまで各地域センターで実施されていたHLA・HPA関連技術協力すべて担う事としたこともあり、集約後2009年度の医療機関検査数は2,392本であった。同年度の全国での技術協力総本数の65%を占めていた。

検査施設の集約を機に、TRALIを含めた非溶血性副作用対策および、さい帯血、NAIT、移植関連等の技術協力のあり方については、検査方法の変革を踏まえ受託条件等の全国統一に向けた再考が必要といえる。一方、検査集約により全国の血液センターにおけるこの分野の人材の減少に相反して、臨床での重要性が高まっていること、医療機関での検査レベルが向上していることを鑑み、後進の技術者の育成が不可欠であると考える。

ワークショップ 6

輸血副作用の新しい検査法

平山文也(大阪府赤十字血液センター)

1. はじめに

非溶血性輸血副作用は輸血副作用の中で最も頻度が高く、その内訳としてアレルギー性反応、輸血関連急性肺障害(TRALI)、発熱、血圧低下、敗血症などが挙げられる。いずれにもその発症に製剤側の因子が考えられるが、今回はアレルギー性副作用とTRALIに限って話しを進めることとする。

2. アレルギー性副作用と好塩基球活性化試験

喘息やアトピー性皮膚炎のようなアレルギー疾患においては、最近アレルゲン同定のための新たな検査方法が開発されている。末梢血を試料としアレルゲン候補を末梢血に添加後、末梢血中の好塩基球の活性化を脱顆粒／活性化マーカーであるCD63やCD203cの発現上昇で捉える信頼性のある検査法で、好塩基球活性化試験と呼ばれている。本好塩基球活性化試験ではまずヘパリン加全血にテストサンプルを混和する。次にHLA-DR抗体とCD123抗体とCD63抗体あるいはCD203c抗体を添加し、HLA-DR陰性、CD123陽性でプラスティックマニホールドに入る細胞(リンパ球と同程度あるいはやや大型の細胞)を好塩基球とし、最終的にそのCD63あるいはCD203cの発現上昇を解析するものである。我々は、この好塩基球活性化試験がアレルギー性輸血副作用の検討に応用できる可能性を検討するため、アレルギー性輸血副作用9症例と輸血副作用を生じなかった症例12例の当該血小板残余製剤の上清(PC-SN)を用いて、その反応性を比較した。本実験での好塩基球のソースとしては当該患者の血液ではなく、無関係な健常人の全血を用いた。アレルギー性反応を惹起した9検体のPC-SNのうち3検体は、5人の健常人好塩基球のうち少なくともひとり以上の好塩基球を活性化させた。3検体中1検体は、5人すべての好塩基球を活性化させた。他の2検体はそれぞれ3人、1人の好塩基球を活性化させた。5人すべての好塩基球を活性化させた検体は非常に顕著なCD203c発

現上昇を惹起したが、1人の好塩基球しか活性化させなかった検体によるCD203c発現上昇は僅かであった。一方、アレルギー性反応を惹起しなかった12検体のPC-SNのうち1検体が、予期しない結果ではあるが、好塩基球活性化試験陽性となった。しかし、陽性となったのは、5人の好塩基球のうち1人の好塩基球のみであり、CD203c発現上昇の程度も僅かであったことから、好塩基球活性化試験擬陽性と思われる。以上、好塩基球活性化試験はアレルギー性輸血副作用を解析するに当たり有用な手段となるであろうことが示されたと考えられる。

3. TRALIにおける好中球活性化試験とHeparin-binding protein

製剤に抗体が存在することだけでは副作用の要因となった証左としては弱い。そこで、好中球の関与を検討するために我々は最近、試験管内で全血を用いて好中球の活性化を検討できる好中球活性化試験を樹立した。この検査法は、ヘパリン加全血を試験サンプルや血液製剤で刺激し、好中球の脱顆粒をモニターするものである。好中球のアズール顆粒や分泌小胞に貯留されているHeparin-binding protein(HBP)の放出を脱顆粒の指標とした。HBPを指標とした理由は、HBPが、 β 2インテグリンを介する好中球の活性化によって引き起こされる血管壁透過性亢進に重要な役割を果していることが最近明らかにされており、また血漿のリーコード多臓器不全を特徴とするstreptococcal toxic shock syndromeにおいてもHBPが同様の働きをしていることが報告されていることから、非溶血性副作用においても患者の血管壁透過性亢進が惹起されるのではないかと考えたからである。実際にHLA抗体や免疫複合体の刺激後30分以内に好中球からHBPが放出されることが確認された。

4. おわりに

非溶血性輸血副作用、とくにアレルギー性副作用とTRALIの発症には製剤側の因子の重要性が示されていることから、副作用のリスクを低減化す

る新たなストラテジーを見出すためには、それら副作用の病態をより正確に解明していく事が重要である。