

ワークショップ 6

輸血検査の現状と課題

ワークショップ 6 司会のことば

輸血検査の現状と課題

石川善英(日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)

紀野修一(旭川医科大学病院臨床検査・輸血部)

安全な輸血のため、ABOとRhD型等の抗原抗体検査、不規則抗体スクリーニング検査、交差適合試験がルーティン検査として行われている。今回のワークショップでは、不規則抗体検査、HLA検査、HPA検査、好中球検査、血漿蛋白抗体検査についての現状と課題について5名の先生の講演を頂いた。

不規則抗体検査に関しては、福島県立医科大学附属病院輸血・移植免疫部の安田広康先生から、自験82,233件のスクリーニング検査の結果に基づいた輸血検査システムの違いによる不規則抗体検出率についての報告があった。PEG-間接抗グロブリン法による検査はアルブミン-間接抗グロブリン法に比べ、臨床的に意義の高い抗体の検出率が高く臨床的意義の低い抗体の検出率は低いこと、スクリーニング間隔を2週間から1週間に短縮することで臨床的意義の高い抗体の検出率がさらに増加し、複数輸血患者の遅発性溶血性副作用が減少したことが報告された。

HLA検査に関しては、東京都赤十字血液センターの柏瀬貢一先生からHLA抗原検査と抗体検査の最新の状況について報告された。PC-HLAドナーのタイピングに核酸検査が導入されたこと、血清学的検査では、HLA抗体検査に精製抗原を用いた方法およびHLAクロスマッチにICFA法が導入され、高感度になったことが報告された。しかし、検査結果と輸血結果の乖離がみられる場合があり、今後の検討課題とされた。

HPA検査に関しては、埼玉県赤十字血液センターの森田庄治先生からHPA検査の現状と今後の課題について報告があった。HPA検査は血小板輸血不応答、新生児血小板減少症などの輸血副作用の原因究明に用いられるが、HPA抗原検査は血清学的検査から遺伝子検査に変わりつつあること、HPA抗体検査は最近遺伝子組換え抗原を用いた抗体検査が導入されていることが報告された。今後の課題として、一つの方法で効率的なスクリーニングと特異性を確認できる方法がないので、改良が望まれること、検査の標準化が必要であることが述べられた。

好中球抗体は、新生児好中球減少症やTRALIなどの輸血副作用を起こした患者にしばしば検出されるが、実際に検査を行える施設は少ない。広島大学病院診療支援部の平岡朝子先生に好中球輸血検査の実際を自験例を中心に紹介していただいた。また、造血幹細胞移植において用いられる支持療法の一つである顆粒球輸血に対する好中球検査体制確立が望まれることが呈示された。

IgA欠損、ハプトグロビン欠損など血漿中の蛋白質に対する抗体が原因で発症する輸血副作用が知られている。非溶血性輸血副作用発症患者での血漿蛋白抗体の検査に関し、日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所の嶋田英子先生から、今までに検出されている血漿蛋白抗体と輸血副作用の歴史や今後の展望について解説頂いた。

ワークショップ 6

不規則抗体検査：遅発性溶血性輸血副作用の削減をめざして

安田広康，奥津美穂，川畑絹代，小野 智，斎藤俊一，菊地正美，高瀬由美子，佐久間友姫
小野貴子，渋谷理絵，橘川寿子，高崎美苗，菅原亜紀子，大島久美，Kenneth Nollet，大戸 斉
(福島県立医科大学附属病院輸血・移植免疫部)

【はじめに】

カラム凝集法は判定の客観性や輸血検査の自動化の普及に伴い，近年日常の輸血検査に広く用いられている。また，間接抗グロブリン試験(IAT)の反応増強剤はカラム凝集法の普及に伴い，低イオン強度溶液(LISS)が42%と最も汎用されている¹⁾。しかし，不規則抗体スクリーニング(Sc)に占める試験管法の割合は現在もなお58%と高く，検出感度に優れているポリエチレン・グリコール(Peg)²⁾の普及率は年々増加し，これまで主流となっていた重合ウシ・アルブミン(Alb)を凌ぐに至っている(Peg:32%，Alb:25%)。さらに，輸血によって新たに産生された同種抗体検体の検出には前述した検査法固有の検出力や反応増強剤以外にも，検体の採取時期が関与している可能性がある³⁾。そこで，2006年9月より頻回輸血患者のためのSc間隔を2週間から1週間へ変更し，輸血の際には24時間以内に採取した検体を用いてPeg-IAT単独でScおよびLISS-IATで交差適合試験をするシステムに変更した。そこで，この輸血検査システムの導入が，不規則抗体検出率の向上と遅発性溶血性輸血副作用(DHTR)の削減に有効であったかどうか検討した。

【対象・方法】

1989年1月から2011年5月の間にScを実施した82,233人(うち輸血患者18,546名)を対象とした。対象は，生理食塩液法(室温10分インキュベート，Sal-RT)／Alb-IATおよび酵素法併用期間(A群：1989年1月～1996年12月，対象31,086人のうち輸血患者4,651人)，Sal-RT／Peg-IATおよび酵素併用期間(B群：1997年1月～2006年8月，32,601人のうち輸血患者6,235人)，生理食塩液法(即時遠心判定，Sal-IS)／Peg単独期(C群：2006年9月～2011年5月，18,546人のうち輸血患者3,857人)の3群に分類した。頻回輸血患者のSc間隔はA群とB群は直

近の輸血から2週間以上経過した際に，C群は1週間以上経過した際に実施した。また，交差適合試験はA群ではAlb-IAT，BとC群ではLISS-IATで採血後3日以内の検体を用いて実施した。

【結 果】

各群の抗体検出率とDHTR頻度を比較した。全期間の抗体検出率は1.22% (1,005/82,233件)であり，各群の検出率はそれぞれA群1.13%，B群1.22%，C群1.38%であり，なかでもC群の検出率はA群に比し有意に高値($p=0.014$)だった。反応増強剤をAlbからPegに変更したB群では，A群に対し抗Eおよび抗Jk^aの検出率は有意に高くなり，冷式抗体の抗P₁および抗Le^bの検出率は有意に低下した。Sc間隔の目安を7日としたC群では，A群に対しPeg-IATによって抗Cおよび抗Fy^bの検出率は有意にさらに高くなり，Sal-ISの導入によって冷式抗体である抗Le^aと抗P₁の検出率は有意に低下した。さらにC群はB群に対し，抗Fy^bの検出率は有意に高くなったが，冷式抗体である抗P₁は有意に低下した(表1)。

また，DHTRの頻度はA群の14/4,651人(0.3%)に比し，B群は8/6,235人(0.13%， $p=0.047$)，C群は2/3,857人(0.05%， $p=0.017$)とそれぞれ有意に低値となった(表2)。

【考察・結語】

Alb-IATに比しPeg-IATは臨床的に意義の高い抗Rhの検出率が高く，臨床的意義の低い抗Lewisや抗P₁の検出率は低いことが確認された。Sc検査法をAlb-IATからPeg-IATに，またSc間隔の目安を直近の輸血から2週間から1週間に変更することによって，Rh，Kidd，Duffyに対する臨床的意義の高い同種抗体の検出率が増加した。また，輸血検査システムの変更によってA群に比し，B群とC群でDHTRが有意に減少したが，このDHTRの削減

表 1 輸血検査システムの違いによる各種同種抗体の検出頻度

		A群	B群	C群	p値		
検査システム		Sal-RT Alb-IAT Bro	Sal-RT Peg-IAT Bro	Sal-IS Peg-IAT	A群 vs B群	A群 vs C群	B群 vs C群
採血タイミング		14日	14日	7日			
症例数		31,086人	32,601人	18,546人			
陽性数 (%)		351 (1.13)	398 (1.22)	256 (1.38)	NS	0.014	NS
血液型	抗体特異性						
Rh	D	8 (0.03)	14 (0.04)	5 (0.03)	NS	NS	NS
	C	5 (0.02)	9 (0.03)	12 (0.06)	NS	0.005	NS
	c	27 (0.09)	33 (0.10)	11 (0.06)	NS	NS	NS
	E	98 (0.32)	158 (0.48)	111 (0.59)	<0.001	<0.001	NS
	e	3 (0.01)	7 (0.02)	7 (0.04)	NS	NS	NS
MNS	M	25 (0.80)	18 (0.06)	9 (0.05)	NS	NS	NS
	S	5 (0.02)	8 (0.02)	10 (0.05)	NS	NS	NS
Lewis	Le ^a	111 (0.36)	112 (0.34)	46 (0.25)	NS	0.009	NS
	Le ^b	32 (0.10)	4 (0.02)	11 (0.05)	<0.001	0.036	NS
Duffy	Fy ^b	7 (0.02)	13 (0.04)	24 (0.13)	NS	<0.001	<0.001
Kidd	Jk ^a	2 (0.01)	20 (0.06)	6 (0.04)	<0.001	NS	NS
	Jk ^b	3 (0.01)	4 (0.01)	2 (0.01)	NS	NS	NS
P	P ₁	50 (0.16)	24 (0.07)	4 (0.02)	<0.001	<0.001	0.026
Diego	Di ^a	15 (0.05)	20 (0.06)	23 (0.12)	NS	NS	NS
その他		14 (0.05)	12 (0.04)	16 (0.09)	NS	NS	NS

Sal-RT：生理食塩液法—室温10分，Sal-IS：生理食塩液法—即時遠心判定，Bro：プロメリン法

Alb-IAT：アルブミン-間接抗グロブリン試験，Peg-IAT：ポリエチレン・グリコール-間接抗グロブリン試験

表 2 輸血検査システムの違いによるDHTRの頻度と原因抗体

	A群	B群	C群
輸血患者数	4,651	6,235	3,857
DHTR患者数 (%)	14 (0.3)	8 (0.13) *1	2 (0.05) *2
抗体特異性 (複数抗体を含む)			
Rh	11	7	2 *3
Kidd	2	3	2
MNS	5	0	1
Duffy	1	0	0
Diego	1	0	0
その他	2	1	1

*1 A群とB群：p=0.047

*2 A群とC群：p=0.017

*3 A群とC群の抗Rh：p=0.053

効果にはAlb-IATからPeg-IATへの変更と輸血患者のSc間隔の目安を2週間から1週間に変更した効果と考える。なかでも、抗Eや抗CなどのRh関連抗体の検出率の増加はA群に対するC群のDHTRの減少に関連していた可能性が高い。最終的に、C群

でのDHTR頻度は0.05%（すなわち5/10,000人）であるが、この頻度はWintersら⁴⁾のゲル・カラム凝集法によるDHTR頻度(5/10,000人)と一致した。一方、Peg-IATによるSc期間においては酵素法(プロメリン法)で先行陽性となるDHTR例がなかったこ

表3 抗体検出における酵素法の効果：Bro法がPeg-IAT法より先行陽転した症例数と同種抗体

	A群	B群
検査システム	Sal-RT	Sal-RT
	Alb-IAT	Peg-IAT
	Bro	Bro
症例数	31,086	32,601
Sc陽性率(%)	1.13(%)	1.22(%)
Bro法先行陽転数	6	0
抗体特異性		
c	2	0
E	2	0
c	1	0
D	1	0

とから、酵素法(プロメリン法)はDHTRの削減に影響を与えなかったと考える(表3)。

したがって、DHTRの削減にはPeg-IAT法を用いる輸血検査システムの導入と、頻回輸血患者では

24時間以内に採取した検体で1週間を目安としたScおよび交差適合試験の実施が有効であると考え

文 献

- 1) 平成22年度日臨技臨床検査精度管理報告書—輸血検査部門⑧輸血検査サーベイ報告, 2010.
- 2) 山口富子, 安田広康, 佐藤久美子, 岩渕伸枝, 赤間敏子, 大戸斉: 不規則性抗体スクリーニングにおけるポリエチレングリコール間接抗グロブリン試験の評価: プロスペクティブ研究. 日本輸血学会雑誌. 45: 462-465, 1999.
- 3) Working Party of the British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task

Force: Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. Transfusion Medicine 14: 59-73, 2004.

- 4) Jeffrey L. Winters, Elie M. Richa, Sandra C. Bryant, Craig D. Tauscher, Brenda J. Bendix, and James R. Stubbs: Polyethylene glycol antiglobulin tube versus gel microcolumn-influence on the incidence of delayed hemolytic transfusion reactions and delayed serologic transfusion reactions. Transfusion. 50: 1444-52, 2010.

ワークショップ 6

HLA検査の現状と課題

柏瀬貢一(東京都赤十字血液センター)

血液センターで実施している主なHLA関連検査業務は、HLA適合血小板の安定供給(PC-HLA)である。従来、HLA関連検査法はLCT法を基本とし、約20年以上前から2010年まで日赤の標準検査法として使用されてきた。しかしLCT法は検出感度が低いうえ生きたリンパ球が必要で、さまざまな制約、問題を抱えていた。

そこで、以下のコンセプトの基、試験方法を開発し2010年に新たな検査法の導入を行った。

1. 検査材料は生きたリンパ球の使用をやめ、安定性の高い、DNAや精製抗原を使用する。
2. 肉眼的判定やフローサイトメトリーの使用をやめ、GMPに準拠すべき測定値が客観的に得られるLuminex装置を使用する。
3. 自家製造試薬の使用をやめ、品質が安定した試薬キットを使用する。

☆HLAタイピングについて

既に骨髄バンクのドナー検査には導入済みであるが、PC-HLAドナーのHLAタイピングにも核酸を用いた検査法が導入された(2010年4月)。この検査法は、従来のLCT法と比べ正確性、多数検体能などが優れており、抗血清のスクリーニングやタイピングトレイ作製の必要がないため、事業の効率化に大いに貢献した。HLAタイピングを実施した件数を図1に示す。PC-HLAを安定供給するためにはより多くのドナーのタイピングが必要である。

☆HLA抗体検査について

患者のHLA抗体検査に精製抗原を用いたWAKFlow MRが導入された(2010年12月)。従来は施設ごとで異なった方法が使われており、感度、特異性に施設間差があったが、全国統一された精製抗原キットを用いることで、これらの改善が期待されるところである。

最近、LABScreen Single Antigenにて、HLA抗体

のビーズへの反応が血清中の補体成分によって抑制され、EDTA添加により解消することが報告された(Schnaidt M, et al. 2011 Transplantation)。今回導入されたWAKFlow MRも同様の現象が起きることが判明し、今後は血漿で検査を行うか、血清にEDTAの添加を行うことが必須であると考えられる。

☆HLA交差適合試験について

HLA交差適合試験にICFA法が導入された(2010年12月)。ICFA法の原理を図2に、HLA交差適合試験を実施した件数を図3に示す。検査開始後約半年間の施設別陽性率は最大で6.5%、最小で1.8%と施設間差が大きく手技の安定性に問題が残されている(図4)。また、全国平均の陽性率は約2.8%とLCT法と比べ高率である。陽性となった約半分は原因が不明で(図5)、ICFA法の導入(カットオフ2.0以上を陽性とした)は感度と引き換えに特異性を犠牲にした感が重めない。適正なカットオフの設定など再検討が必要と考えられる。

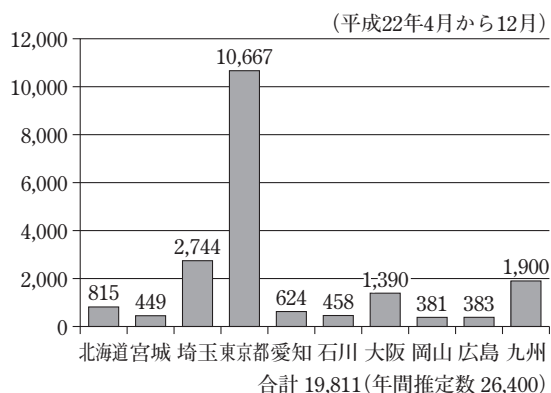


図1 施設別のタイピング検査数

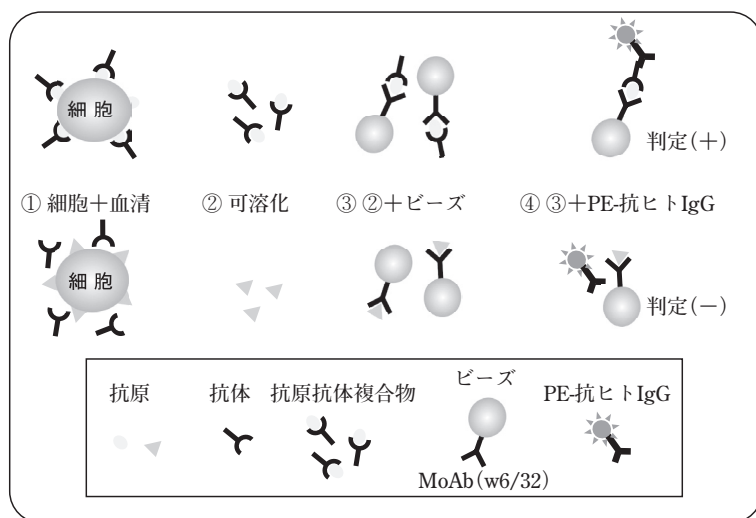


図2 ICFA法の原理

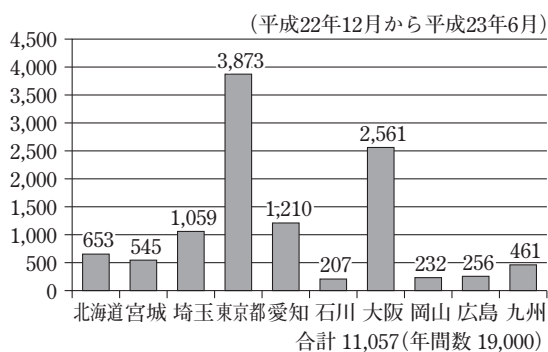


図3 施設別の交差適合試験数

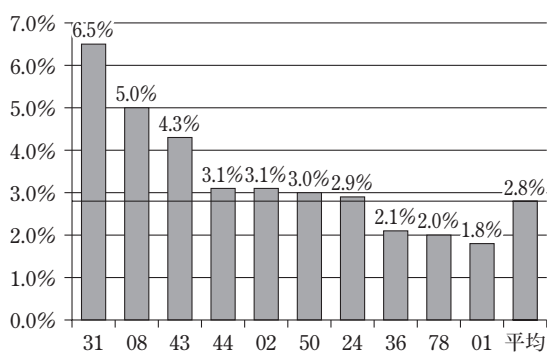


図4 施設別の交差適合試験の陽性率

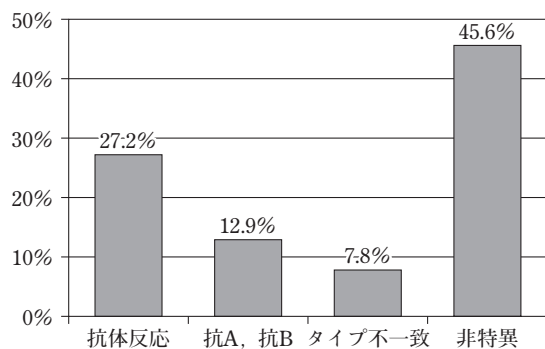


図5 交差適合試験の陽性原因

ワークショップ6

HPA検査

森田庄治, 井上 進, 永守拓哉, 田原綾乃, 岡崎晃士
 小林洋紀, 加藤尚美, 石島あや子, 峰岸 清, 柴田洋一, 南 陸彦
 (埼玉県赤十字血液センター)

【はじめに】

HPA(human platelet antigens: 以下HPA)検査は, 血小板輸血不応答(platelet transfusion refractoriness: 以下PTR), 新生児血小板減少症(neonatal alloimmune thrombocytopenia: 以下NAIT), 輸血後紫斑病(post-transfusion purpura: PTP), 輸血副作用の原因究明に用いられる。血液センターで実施しているHPA検査は, 血小板製剤を輸血しても輸血効果が得られないPTR症例について, HPA抗体検査を実施し, HPA抗体陽性患者にはHPA型適合の血小板製剤を供給することを目的としている。ここでは本邦におけるHPA検査の現状, および問題点や今後の課題についても言及する。

【HPA検査の現状】

表1に各HPA抗体検査およびHPA型検査の特徴を示す。

1) HPA型検査

HPA型検査は従来, MPHA法やPSIFT(FCM)法などの血清学的検査で実施されてきたが, 特異性に優れた良質な抗血清の確保が容易ではないこと

から, 現在は遺伝子による型検査(PCR-SSP法, -SSO法, -RFLP法, -SSCP法)が主流となっている。当血液センターでは新規HLA登録献血者のHPAタイピングを行う際に, Nak^a抗原にはMPHA法を, HPA-1から6にはPCR-SSP法を使用し HPA型検査を実施している。また, 一部メーカーから遺伝子型検査キットが市販され, 精度の高い結果が得られている。

2) HPA抗体検査

主な方法としてMAIPA法, PSIFT(FCM)法, MACE法, ELISA法(PakPlus Gen-Probe GTIダイアグノスティックス株式会社), SPAA法, MPHA(M-MPHA)法(anti-PLT・MPHA・スクリーン(スクリーニング用)anti-HPA・MPHA・パネル(同定用)ベックマン・コールター株式会社), Luminex法(PakLX Gen-Probe GTIダイアグノスティックス株式会社)がある。MAIPA法は欧米で汎用されている国際標準法である。本邦ではMPHA法が汎用されている。近年, 遺伝子導入による組み換え抗原を用いたHPA抗体検査が報告されている。

表1 HPA抗体およびHPA型検査法の種類

HPA抗体					HPA型			
検査法	交差試験への応用	複合抗体の識別	使用機器	キット化の有無	検査法	多数検体処理	使用機器	キット化の有無
MPHA法	○	△	—	○	MPHA法	○	—	×
M-MPHA法	○	△	—	△	PCR-SSP法	×	サーマルサイクラー 電気泳動	×
FCM法	○	△	フローサイトメーター	×	PCR-SSCP法	×	サーマルサイクラー 電気泳動	×
MAIPA法	△	○	プレートリーダー	×	PCR-rSSO法	○	サーマルサイクラー Luminex	○
ELISA法	×	○	プレートリーダー	○				
Luminex法	×	○	Luminex	○				

【HPA検査の課題】

表2にHPA型検査およびHPA抗体検査の課題を示す。

1) HPA型検査

多くのHPA抗原は1塩基置換によって抗原性が決定されている。HPA抗原の遺伝子型は自家製試薬、市販キット共にオリジナルで報告された塩基配列を基に検出しているが、変異箇所と同一部位にオリジナルとは異なる塩基置換がある場合には、誤判定の可能性がある。本邦のNAIT症例から見つかったHPA-7b抗原と血清学的には同じ反応性を示すHPA-7newはこの典型例と言える。

Nak^a抗原(CD36分子)欠損の遺伝的原因の多くはexon4領域の478C→Tの1塩基置換であり、市販キットはこの変異を検出している。しかし、この他にもいくつかの変異が報告されており、C478T以外の変異ではNak^a陽性と判定される。このため、型判定は血清学的検査で行うことが重要である。

これらの他にも血清学的検査と遺伝子型タイピングの結果が乖離する例、遺伝子型タイピングに用いる核酸の差(ゲノムDNAとmRNA)によって遺伝子型が異なる例も報告されている。

2) HPA抗体検査

本邦で広く用いられているMPHA法の材料に使用される血小板抗原には、血小板抽出抗原、未固定および固定した血小板細胞が使われているが、これらの抗原の由来により検出可能な場合と不可能な場合がある。たとえば、HPA-15抗体は血小板抽出抗原では検出できないが、インタクト血小板では検出が可能であることが分かっている。このことから、血液センターにおけるPTRの検査時の

HPA抗体検査では主に血小板抽出抗原を使用したMPHA法を実施するため、HPA-15抗体は見逃す可能性があり、NAITの検査時には父(児血小板)と母(児血清)の血小板交差試験を実施しない場合、HPA-15抗体やその他の低頻度抗原、あるいは未知の抗原を見逃す可能性が高いと思われる。さらに、HPA-15は血小板上の発現量に個人差が認められるため、検査に使用する抗原としての血小板の選択には注意しなければならない。

また、HPA-3には安定した抗原性を示すものと不安定な抗原性を示すものがあり、抗原エピトープに固定処理や可溶化すると消失する部分があることが分かっている。我々の経験したNAIT症例で、固定したインタクト血小板を用いたMPHA法では未検出、未固定のインタクト血小板を用いたM-MPHA法で検出されたHPA-3b抗体も、これらが原因と考えられる。このように、本邦で標準法とされているMPHA法でも、さまざまな課題が挙げられる。したがって、現状では複数の検査法を組み合わせる総合的に検査結果を判定せざるを得ない。

【考 察】

HPA型検査は従来の血清学的検査から遺伝子型検査へ移行しているが、輸血領域の型判定では遺伝子よりもその産物である抗原そのものが重要である場合も少なくない。しかし、血清学的検査に使用可能な良質な抗血清の確保は容易ではなく実質的には不可能であるが、血清学と遺伝子型の検査結果には乖離が生じる可能性を常に念頭におき実務にあたる必要があると思われる。

HPA抗体に用いられている各検査法は、HPA抗体の特異性や抗体価、HPA抗原の血小板上の発現

表2 HPA検査の課題

HPA型検査の課題

- ・現在市販されているNak^aのDNAタイピング試薬ではすべての陰性を判定することはできない。
- ・HPAの抗原性を決定する変異箇所オリジナルとは異なる塩基置換がある場合には誤判定の可能性がある。
- ・血清学的検査とDNAタイピング結果が乖離することがある。

HPA抗体検査の課題

- ・本邦で広く実施されているMPHA法に使用する血小板抗原の由来により検出できる抗体と検出できない抗体がある。HPA-15抗体は血小板抽出抗原で検出されない。
- ・抗原性が安定に保たれないHPA抗原が存在しているため、新鮮な血小板が必要となることがある。HPA-3の抗原エピトープに固定処理や可溶化すると消失する部分がある。

量の差などの原因により、結果の乖離を認めることがある。現状では1つの検査法で効率的なスクリーニングと特異性の確認の両面で優れた方法がないことから、HPA抗体検査を行う場合、可能な限り複数の方法を組み合わせて実施するのが最善と考えられる。とくにPTR患者では、広範囲な血小板パネルと反応することが多く、HLA抗体とHPA抗体の識別可能な方法を併用すると詳細な検

査結果を得ることが可能である。まれなHPA型の抗原パネルの確保や、発現量の少ない特定のHPA抗原それに個人差のある抗原を抗体検査に使用する目的で、分子生物学的手法を用いて人工的に得る試みが行われている。このような抗原を使用した現行法の改良や新たな方法を開発し、HPA検査法を標準化していくことが今後の課題であると考ええる。

ワークショップ 6

好中球抗原・抗体検査の現状と課題

平岡朝子(広島大学病院診療支援部)

新生児好中球減少症やTRALIなどの輸血副作用を起こした患者において抗好中球抗体が、しばしば検出されるが、実際にその検査を行っている施設は少ない。当院で行っている抗原、抗体検査の現状と課題について報告する。

ヒトの好中球抗原の命名法は1999年にBuxらによりHuman Neutrophil Antigen; HNAで表現することが提唱された。HNAには好中球のみに発現しているHNA-1, HNA-2と他の白血球, 血小板等にも発現しているHNA-3, HNA-4, HNA-5がある。また, HNA以外に日本赤十字大阪血液センターの平山らがTRALIの発症に関連があると報告したSiglec-14やI式血液型, P血液型, Le^xとSialy-Le^x (CD15), HLAクラスIなどとさまざまな抗原が存在している。表1は, HNA-1~5までの抗原と発現頻度を示した。

HNA-1はGPIアンカーで細胞膜表面に結合しているFc γ RⅢb上の1塩基の違いによりHNA-1a, 1b, 1cに分類される。またストップコドンの挿入により抗原が欠如したHNA-1-nullが0.1から0.2%の頻度で存在する。特徴的なことは1aと1bの比率が白人とアジア人では逆転していることで, 日本でも西日本よりも東日本で1bの割合が高いことが報

告されている。アジア人ではHNA-1cの報告はない。HNA-1のDNAタイピング法はルミネックスを使用するキットが湧永製薬から, HNA3以外のHNA1~5までをアガロースゲルの電気泳動で判定するキットがG&T Biotechから市販されている。

HNA-1抗体は最も多く検出される抗体で, 新生児好中球減少症の50%以上で検出される。その他, 自己免疫性好中球減少症や非溶血輸血副作用症例で報告があるが, HNA-1-nullタイプが産生する抗Fc γ RⅢb抗体は強い好中球減少を引き起こすと報告されている。

HNA-2は同様にGPIアンカーで細胞膜に結合しているLy6/PAR スーパーファミリーに属する糖タンパクでありCD177にクラスター分類されている。RNAミスプライシングにより抗原が欠如し, 感作によりHNA-2a抗体が産生される。TRALIなどの非溶血輸血副作用や新生児好中球減少症, 薬剤性好中球減少症や移植不全の報告がある。特徴的な二重性の抗原で, 細胞表面の抗原発現量を陰性と陽性の割合で検査する必要がある。また妊娠により陽性抗原率が増加することが報告されている。

HNA-3, 4, 5は単球やマクロファージなど好中球以外の白血球にも発現している抗原で, そのう

表 1

HNA	Location	Antigen Frequency(%)	
		アジア人*	白人*
HNA-1a	CD16(Fc γ RⅢb)	90.8	54
HNA-1b	CD16(Fc γ RⅢb)	57.2	88
HNA-1c	CD16(Fc γ RⅢb)	0	5
HNA-2	CD177	88.4	97
HNA-3a	CTL2	94.4	95
HNA-3b	CTL2	46.7	70
HNA-4a	CD11b	100	92
HNA-5a	CD11a	97.6	85

*発現頻度は2011年にXia W.らにより報告された中国漢民族をアジア人とし, アメリカWisconsinのBCのHPに掲載されたCaucasianを白人とした。

ちHNA-3は現在一番話題となっている抗原である。HNA-3a抗体は、致死的なTRALIを発症することで知られているが、遺伝子が特定されていなかった。近年、ドイツのReil A.やアメリカのBR. CurtisらがHNA-3抗原は、Choline transporter-like protein2 (CTL-2)の遺伝子SLC44Aにより規定されることを報告し、すぐにタイピング法が開発された。HNA-3a抗体の報告症例は少ないが、漢民族では5～6%の人が3bのホモタイプとなり、妊娠、輸血などの免疫刺激により抗体を産生する可能性があるとしてXia Wらが報告している。日本で起こったTRALIを発症した供血者のHNA-3a抗体を用いた血清学的検査では、日本人の約20%が3b陰性であるとする斉藤らの報告もあり、さらなる研究が必要と思われる。

HNA-4は白血球の接着分子CD11b(MAC-1)、HNA-5はCD11a(LFA-1)の β 2ミクログロブリンのサブユニットに抗原があり一塩基配列の違いによって決定され、新生児好中球減少症でHNA-4a抗体(MART)やHNA-5a抗体(OND)の報告がある。東京大学医学部付属病院輸血部川端らは日本人のHNA-4の頻度は、100% 4aaであり、HNA-4a抗体を産生することはなく、HNA-5では日本人の2%が5bbとなり、HNA-5a抗体を産生する可能性があるとして報告しているが、日本での抗体症例報告はない。

一般的な好中球抗体の検査法にはGranulocyte Agglutination test : GAT, Granulocyte Immuno-Fluorescence Test : GIFTがある。ともに古くからある検査法で、GATはマイクロトレイ中での白血球の凝集で判定される。抗HNA-3aの検出に有効とされているが、陰性対照に凝集がみられるなど結果が不安定である。GIFTは最も多くの施設で行われている検査法である。当院では全血法で行っているが、はじめに、好中球を分離し、パラホルムアルデヒドで固定してから行っている施設もある。細胞に抗体を感作させた後、抗ヒト二次抗体を結合させてフローサイトメーターで測定する。平山らは5種類の細胞(T, Bリンパ, 好中球, 血小板, 単球)を一度に検査する方法を開発しているが、TRALIなどの非溶血輸血副作用にみられる好中球抗体の多くがHNAに特異的でないとの報告を行っ

ている。

その他、好中球抗体の検査法はMoAbを用いるMAIGA、東京大学医学部付属病院輸血部宮本や日本赤十字兵庫血液センター荒瀬らが開発したMPHA法、GCT、EIA等の検査法が報告されている。

生細胞を用いない検査法としてHNA遺伝子導入細胞があり、平山らが開発したKY細胞、日本赤十字中央血液研究所の渡辺らのCHO-KI細胞が知られている。平山らのKY細胞の反応性からHNA-2a抗体を同定することができたGIFT非特異症例を、2010年にISBTのアジア部会で当院栗田が報告した。またMAIGA法の変法として遺伝子導入細胞を用いて抗HNA-2抗体を同定した報告もある。好中球抗体はHLA、HPA抗体など他の抗体とともに検出されるため特異性を決定ことは血液細胞の反応性だけでは困難である。当院でGIFTを行い、抗Fc γ R III b抗体と同定されたTRALI疑いの症例において、患者のHNA遺伝子タイピングとKY細胞の反応性により、患者血清中の抗体Fcが非特異に好中球膜Fcレセプターと反応したと同定されたケースもあり、遺伝子導入細胞を用いる検査法は有用と思われる。

結論として、血液細胞で行うGIFTだけでは好中球検査は不十分であるとする結論になるが、遺伝子導入細胞を検査に用いるためには細胞の継体培養が必要である。また使用時には計時的な減弱がないか検定する必要もある。保険適応のない検査であるため研究費のなかで行う必要があり、経費、人、時間の制約を受ける。検査実施施設の少なさも問題で、外注で抗体検査を依頼できるものの、GIFT法による定性の判定になってしまう。GIFTだけでは正確な検査結果を得られず、HLA抗体検査のように、遺伝子産物を利用したルミネックス法などの新しい検査法の開発が最大の課題と思われる。

近年、感染症対策として顆粒球輸血を行う施設もあり、当院でも慢性肉芽腫の移植症例で行われている。ドナー選択、抗体の有無、抗体産生のモニタリングのため、院内で好中球抗原、抗体検査体制を整備することは必要であると考えられる。

ワークショップ 6

血漿蛋白抗体検査

嶋田英子(日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)

血漿蛋白の個人差

抗凝固剤入り血液の遠心上清である血漿には、多様な働きを担う多種のタンパク質が含まれる。アルブミン、免疫グロブリンなどのいわゆる“古典的血漿蛋白”として100種類以上が、さらに、近年のプロテオミクスの手法により3,000種類以上が検出されている。これらの血漿蛋白の濃度の範囲は広く、最も多量のアルブミンと最も微量な成分との濃度差は10の11乗にもおよぶ。表1に輸血副作用に関連する血漿蛋白の欠損、ハプトグロビン、IgA、IgA2サブクラス、補体C9欠損について示すが、その他にも多くの血漿蛋白で欠損者が報告されている。古典的血漿蛋白には、“血清型”と呼ばれる多型性が知られている。また、多くの血漿蛋白は糖鎖を結合した糖タンパク質である。 α 2マクログロブリン、vWF等はABO型の血液型糖鎖を結合することが報告されている。翻訳後修飾や疾患によって抗原性が変化すれば、抗体産生の原因となる可能性も考えられる。このように血漿蛋白は多種で、複雑な個人差が想定される。

血漿蛋白抗体検査

患者血液中に産生された血漿蛋白抗体は、輸血された血液中の当該血漿蛋白と反応してアナフィ

ラキシー反応等の輸血副作用発生の原因となることがある。そこで、従来からさまざまな方法、すなわち、寒天ゲル内の沈降線形成、赤血球やラテックスビーズの凝集反応、マイクロプレートや転写膜上での酵素標識抗体を用いた検査(ELISA, Western blot)、血漿蛋白の酵素活性の中和等によって検査が行われてきた。近年では、表面プラズモン共鳴や蛍光ビースを用いた方法なども検討されている。血漿蛋白抗体の検査には、これらの手技や感度の特徴を持った種々の方法を選択して使用することができるが、現在は、市販のキット等が入手できないことから試薬を自家調整する必要がある。非溶血性輸血副作用の抗体検査には高感度の方法が必要である。

輸血副作用との関連

日本赤十字社では、1993年より、医療機関の協力を得て非溶血性輸血副作用発症例の血漿蛋白抗体の検査を実施してきた。欠損や多型、変異体が報告される15種類の血漿蛋白を対象として検査を行った結果、非溶血性輸血副作用発症患者で、献血者よりも高率に血漿蛋白抗体が検出された(表2)。しかし、この中で欠損が確認された例はわずかであった。同定された欠損者の解析から、

表1 非溶血性輸血副作用患者で認められた血漿蛋白欠損

血漿蛋白(略語)	頻度	主な原因遺伝子	産生抗体	抗原を含む血液による非溶血性輸血副作用
ハプトグロビン(Hp)	約4,000人に1人	Hp^{del}	IgG (IgM)	アナフィラキシーショックなど重篤症例がある
IgA	約10,000人に1人	不明	IgG IgE	アナフィラキシーショックなど重篤症例がある
IgA2	—	不明	IgG (IgM)	軽微な症例が多い
C9	約1,000人に1人	Arg95Stop	IgG	軽微～中等度、副作用の発生報告の頻度は低い

セルロプラスミン、 β 2-グリコプロテインI、トランスフェリン、アルブミン、 α 1-アンチトリプシン、凝固因子(FVIII, IX, vWF, PS, PCなど)の欠損も報告されているが、非溶血性輸血副作用発症患者では検出されていない。

日本人における輸血副作用の原因因子として、先天性Hp欠損が見出された。Hp欠損の原因は遺伝子の欠失、すなわちHp^{del}アレルのホモ接合体による。日本人の健常人献血者におけるHp欠損の頻度は、欧米で比較的高頻度に検出され輸血アナフィラキシーの原因とされるIgA欠損の頻度よりも高

く、Hp欠損者は輸血でIgGクラス抗体に加えてIgEクラス抗体を産生する。日本以外では韓国、中国などの東アジア、タイなどの東南アジアに分布する（図1, 2）。今日までにHp欠損者(29例)とIgA欠損者(6例)が副作用発症例で見出されている。Hp欠損やIgA欠損は抗体を産生し、国内における

表2 非溶血性輸血副作用発生患者の血漿蛋白抗体検査

血漿蛋白	(略号)	欠損	多型(変異)	抗体陽性数[%] (陽性/検査数) ^a	欠損数
1 Haptoglobin	(Hp)	有	有	13/4,600 [0.3%]	9
2 IgA	(IgA)	有	有	144/4,600 [3.1%]	3+(2* ¹)
3 C9	(C9)	有	有	63/4,600 [1.4%]	3
4 α 2-Macroglobulin	(α 2M)	—	有	81/2,800 [2.9%]	
5 Ceruloplasmin	(Cer)	有	有	38/2,800 [1.4%]	
6 C4	(C4)	有	有	16/4,600 [0.4%]	(1* ²)
7 Transferrin	(Tf)	有	有	1/4,600 [0.02%]	
8 α 1-Acid glycoprotein	(α 1AG)	—	有	0/4,600 [—]	
9 α 2-HS-glycoprotein	(α 2HS)	—	有	1/4,600 [0.02%]	
10 Fibrinogen	(Fbg)	有	有	1/2,800 [0.04%]	
11 Plasminogen	(Pmg)	有	有	2/2,800 [0.07%]	
12 Antithrombin III	(ATIII)	有	有	0/2,800 [—]	
13 Protein C	(PC)	有	有	0/2,800 [—]	
14 Protein S	(PS)	有	有	6/2,800 [0.2%]	
15 β 2-Glycoprotein I	(β 2G)	有	—	0/2,800 [—]	

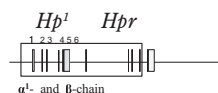
a：精製血漿蛋白を抗原としたELISAで、血漿蛋白抗体(IgG class)が陽性でかつ同抗原を用いたWestern blotが陽性である血清

*1：抗IgA2(サブクラス欠損)

*2：抗C4；Chido(アロタイプ欠損)

- ・29名のHp欠損患者で非溶血性輸血副作用の報告、うち26名(検査可能な全て)はHp^{del}のホモ接合

Hp^{del} Hp遺伝子の全てのエクソンが欠失



日本国内の頻度；0.015
中国、韓国(東北アジア)
タイ(東南アジア)に分布



- ・副作用患者欠損頻度 29/19,200[0.15%]
献血者欠損頻度 1/4,000[0.025%]

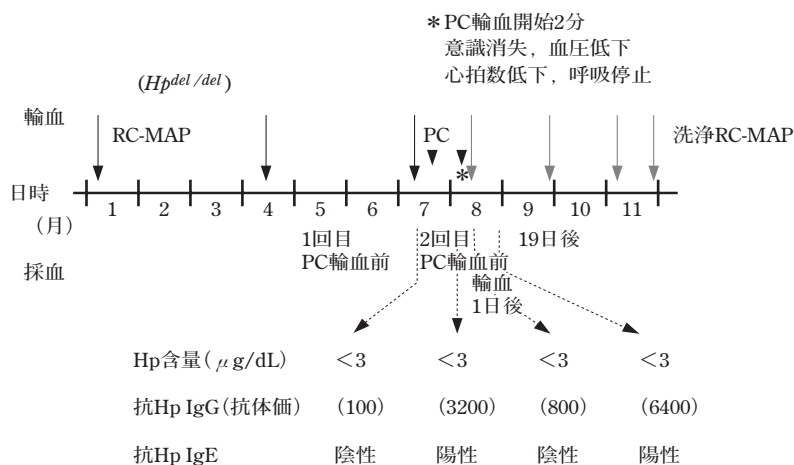
Koda Y, et al. Blood 2000
Shimada E, et al. Transfusion 2007

図1 Hp欠損と非溶血性輸血副作用—Hp^{del}アレル—

図2 Hp欠損と非溶血性輸血副作用—輸血アナフィラキシー—

- ・ 29名のHp欠損患者で非溶血性輸血副作用の報告,
うち17名はアナフィラキシー(様)ショックあるいはショックの報告
- ・ 抗Hp (IgG), 17名では 抗Hp (IgE)

Cae No. 1
経過



Shimada E. 臨床検査 2004

輸血アナフィラキシー発生の原因となる。現在はELISAとWestern blotを用いた6種の血漿蛋白(Hp, IgA, C9, C4, a2M, CER)に対する抗体検査と血清値の定量を行っている。

今後の課題

非溶血性輸血副作用発生患者検体の血漿蛋白抗

体の検査には、患者の個性と輸血製剤との組み合わせが重要であると考え、二次元電気泳動／ウェスタンブロット法等の高感度の交差試験法の検討を行っている。また、輸血副作用と血漿蛋白抗体の関連性をさらに明らかにするためには、未検討の血漿蛋白質についても検討すると共に患者さんの背景の調査も必要と思われる。