

原 著

[原著]

## 生理食塩液法および酵素法による 不規則抗体スクリーニングの臨床的意義

日本赤十字社北海道ブロック血液センター

久保晴敬, 三浦佳乃, 宮崎 孔, 大橋 恒, 松林圭二,  
佐藤進一郎, 加藤俊明, 紀野修一, 池田久實, 高本 滋

### Clinical significance of irregular antibody screening with saline and enzyme technique

*Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center*Harutaka Kubo, Yoshino Miura, Toru Miyazaki, Wataru Ohashi, Keiji Matsubayashi,  
Shinichiro Sato, Toshiaki Kato, Shuichi Kino, Hisami Ikeda and Shigeru Takamoto

#### 抄 録

血液センターにおける献血者血液のPK7300による不規則抗体スクリーニング(生食法および酵素法)は、冷式抗体や非特異反応が多く検出されることが問題となっていた。そこで、IH-1000(間接抗グロブリン法)導入後のPK7300による不規則抗体スクリーニングの意義について検討した。PK7300あるいはIH-1000で不規則抗体陽性または保留と判定された2,476検体を対象にIH-1000のみ陽性をA群(174検体)、PK7300およびIH-1000共に陽性をB群(85検体)、PK7300のみ陽性をC群(2,217検体)の3群に分類して抗体同定率を算出した結果、A群(91.4%)、B群(97.6%)に比べてC群(0.7%)は極めて低く、酵素法の非特異反応がC群全体の75%を占めていた。また、C群の抗体価、免疫グロブリンクラスおよび単球貪食試験(MMA)による性状解析を実施した結果、C群はMMA陰性の低力価抗体であり、その臨床的意義は低いと考えられた。臨床的意義の高い抗体はIH-1000にて検出可能であり、PK7300での不規則抗体スクリーニングを廃止しても輸血用血液の安全性には影響を与えないと考えられる。

Key words: irregular antibody screening, saline, enzyme technique,  
indirect antiglobulin test

#### はじめに

血液センターにおける献血者血液の不規則抗体スクリーニングは、生理食塩液法(以下、生食法と略す)、酵素法、間接抗グロブリン法(以下、Indirect Antiglobulin Test: IATと略す)の3法で実施されている。一般に、生食法は抗M等の冷

式抗体やIgM抗体を検出しやすいこと<sup>1)</sup>、酵素法はRh系の抗体を感度良く検出できるが、非特異反応が多いこと<sup>2)</sup>、またIATは臨床的意義の高いIgG抗体を検出できるという特徴を有し、複数の方法を組み合わせることでより多くの不規則抗体を検出している。生食法と酵素法は自動輸血検査

装置PK7300 (BECKMAN COULTER社製) によるマイクロプレート静置法が採用され、自動化が行われているが、IATは自動化が困難であった<sup>3)</sup>。しかし、平成23年度からは、カード用全自動輸血検査装置IH-1000 (BIO RAD 社製) の導入により、IATは5本プール検体を用いたカラム凝集法が採用され自動化が行われるようになり、PK7300 (生食法および酵素法) とIH-1000 (IAT) による不規則抗体スクリーニングの同時並行検査を実施している。

輸血療法の実施に関する指針 (改定版)<sup>4)</sup> では、輸血用血液は「間接抗グロブリン試験を含む不規則抗体スクリーニングの各検査を行う」と記載されている。また、高感度なIATで不規則抗体スクリーニングを行う場合、酵素法を実施する意義は低いと報告されている<sup>5)~7)</sup> が、血液センターでは前述のとおり複数の方法で実施されている。

今回我々はIH-1000によるIATの自動化導入後の、PK7300での生食法および酵素法による不規則抗体スクリーニングの臨床的意義を明らかにするため検討を行った。

### 対象と方法

平成24年4月～平成25年3月に北海道ブロック血液センターで不規則抗体スクリーニングを実施した献血者検体285,197検体を対象とした。一次検査 (IH-1000およびPK7300による不規則抗体スクリーニング検査) で不規則抗体が陽性と判定された2,476検体をIH-1000 (IAT) のみ陽性の174検体をA群、PK7300 (生食法および酵素法)、IH-1000 (IAT) 共に陽性の85検体をB群、PK7300 (生食法および酵素法) のみ陽性の2,217検体をC群に分類し、二次検査 (手法による確認検査)、三次検査 (パネル血球を用いた同定検査) を行った。また、以下の方法により不規則抗体スクリーニングの臨床的意義を評価した。

#### 1. 抗体同定率の算出方法

一次検査で陽性または保留となった検体を対象に二次検査、三次検査で抗体陽性と判定された検体の割合を算出した。

抗体同定率 (%) = (抗体陽性数 / 一次検査陽性数) × 100

#### 2. フローサイトメトリー法によるアイソタイプの鑑別

抗原陽性血球 ( $3 \times 10^6$  個) に被検血清を25  $\mu$  L 加え、37℃で1時間インキュベーション後、PBSで3回洗浄した。さらに、100倍希釈PE標識抗ヒトIgGおよびIgM抗体 (Jakson社製) を20  $\mu$  L 加えて15分インキュベーションし、PBSで1回洗浄後、FACSCalibur (Becton Dickinson社製) で測定し、IgGおよびIgMの鑑別を行った。IgGが確認された被検血清は抗ヒトIgG1, IgG2, IgG3, IgG4, マウスモノクローナル抗体 (Sigma社製) ならびに100倍希釈PE標識抗マウスIgG抗体 (Jackson社製) を用いてサブクラスの鑑別を行った。

#### 3. 単球貪食試験 (MMA; monocyte monolayer assay) による抗体の機能試験

Arndtらの方法を一部改変して実施した<sup>8)</sup>。Ficoll-Conray法で分離した健常人の単核球を、5%牛胎児血清 (PAA社製) を添加したRPMI1640培地 (Sigma社製) に  $1 \times 10^7$  個/mL となるように再浮遊し、96穴平底マイクロプレート (Nunc社製) に単核球浮遊液を100  $\mu$  L/well ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> 中で37℃1時間インキュベーションしてマイクロプレートウェルに単球を付着させた後、PBSで3回洗浄した。次いで、被検抗体を感作した血球浮遊液 ( $5 \times 10^7$  個/mL) を100  $\mu$  L/well ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub> 中で37℃2時間インキュベーション後、PBSで3回洗浄し、May-Giemsa染色を行った。鏡検によりマイクロプレートウェルに付着した単球100個あたりに付着した赤血球数をカウントして貪食率とした。なお、各被検血清の貪食率は、3名の健常人から分離・調製した単核球浮遊液を個別に使用して3回の測定を行い、その平均値を用いた。また、貪食率は、Arndtら<sup>8)</sup> が報告した貪食率のカットオフ値を参考に0～5%を陰性、5%以上を陽性とした。

## 結 果

#### 1. 抗体同定率

抗体同定率はA群で91.4% (159/174)、B群で97.6% (83/85)、C群0.7% (15/2,217) であった (表

表1 A群, B群, C群の抗体同定率

	二次検査(例)	三次検査(例)	同定率(%)
A群	174	159	91.4
B群	85	83	97.6
C群	2,217	15	0.7

表2 A群, B群, C群の抗体特異性

群	PK7300	IH-1000	特異性	検出数 (%)*
A群	-	+	D, C, E, c, e	38 (23.9)
	-	+	M	37 (23.3)
	-	+	Fy <sup>b</sup>	29 (18.2)
	-	+	Jr <sup>a</sup>	13 (8.2)
	-	+	Xg <sup>a</sup>	11 (6.9)
	-	+	Di <sup>a</sup>	10 (6.3)
	-	+	Le <sup>a</sup> , Le <sup>ab</sup>	6 (3.8)
	-	+	S	2 (1.3)
	-	+	P1	1 (0.6)
	-	+	JMH	1 (0.6)
	-	+	冷式自己抗体	5 (3.1)
	-	+	未同定	6 (3.8)
B群	+	+	D, E, c, e	64 (77.1)
	+	+	M	11 (13.3)
	+	+	冷式自己抗体	7 (8.4)
	+	+	未同定	1 (1.2)
C群	+	-	E	5 (33.3)
	+	-	M	4 (26.7)
	+	-	Le <sup>a</sup> , Le <sup>ab</sup>	4 (26.7)
	+	-	自己抗体	2 (13.3)

\*各群における割合

1)。C群では非特異反応(二次検査が陽性、三次検査が非特異反応)が75.2%で、陰性(二次検査が陰性)が24.1%であった。

## 2. 抗体特異性

A群, B群, C群で同定された抗体の結果を表2に示した。A群は、IAT反応性の抗体(Rh系の抗体, 抗M, 抗Fy<sup>b</sup>, 抗Jr<sup>a</sup>, 抗Xg<sup>a</sup>, 抗Di<sup>a</sup>, 抗Lewis, 抗S, 抗P1, 抗JMH)が多く、全体の約9割を占めていた。B群は、PK7300による酵素法はRh系の抗体を感度良く検出できるため、Rh系の抗体が約8割を占めていた。C群では、Rh系の抗体が約3割であったが、その他は抗Mや抗Lewisであった。

## 3. C群陽性の検体に対する性状解析

C群で同定された15例のうち自己抗体2例を除く13例について性状解析(抗体価, 免疫グロブリンアイソタイプの鑑別, 単球貪食試験)を行っ

た結果を表3に示した。

### 3-1. アイソタイプ

抗EではIgG3, IgMが1例, IgMが1例, IgG1が2例, IgG1, IgMが1例であった。抗Lewisおよび抗MではすべてIgMであった。

### 3-2. 抗体価

抗体価は抗Eでは酵素法で8倍以下, 抗Lewisは生食法および酵素法で2倍以下, 抗Mは生食法で2倍以下の低力価であった。PEG-IATではすべての抗体で陰性であった。

### 3-3. 単球貪食試験(MMA)

C群で検出されたすべての抗体で陰性であった。

## 考 察

今回、一次検査で不規則抗体が陽性と判定された2,476検体について、IH-1000のみ陽性の174

表3 C群陽性検体についての性状解析

No	特異性	アイソタイプ	抗体価			MMA
			生食法	酵素法	IAT	
1	E	IgG3, IgM	-	×4	-	-
2	E	IgM	-	×8	-	-
3	E	IgG1	-	×4	-	-
4	E	IgG1	-	×2	-	-
5	E	IgG1, IgM	-	×8	-	-
6	Le <sup>a</sup>	IgM	-	×1	-	-
7	Le <sup>a</sup>	IgM	-	×1	-	-
8	Le <sup>a</sup>	IgM	×1	×1	-	-
9	Le <sup>ab</sup>	IgM	×1	×2	-	-
10	M	IgM	×2	-	-	-
11	M	IgM	×2	-	-	-
12	M	IgM	×1	-	-	-
13	M	IgM	×2	-	-	-

検体をA群, PK7300および IH-1000 共に陽性の85検体をB群, PK7300のみ陽性の2,217検体をC群に分類し抗体の性状を検討した。A群, B群に含まれるような抗体はIATで検出できる抗体群, C群に含まれる抗体は生食法および酵素法を廃止した場合に検出されなくなる抗体群として考えることができる。

臨床的意義のある抗体とは, 日本輸血・細胞治療学会の赤血球型検査(赤血球系検査)ガイドライン(改訂1版)<sup>9)</sup>では, 対応する赤血球型抗原が陽性の赤血球を生体内で破壊し, 副作用の原因となる赤血球抗体であり, ほぼ例外なく, 37℃反応相からの間接抗グロブリン法で陽性となるとされているが, その特異性と37℃における反応性を考慮した評価が必要で, 今回は抗体の特異性, アイソタイプ, 抗体価, さらに抗体の機能面から臨床的意義を評価した<sup>10)</sup>。

抗体の特異性<sup>11)</sup>から考えるとA群およびB群は, 臨床的意義の高い抗体の占める割合が高かった。C群はRh系の抗体が3割を占めていたが, いずれもPEG-IATは陰性であり, 残りの7割は抗Mや抗Lewisなどの臨床的意義の低いと考えられる抗体であった。

我々が過去に行った献血者の不規則抗体スクリーニングで検出されたIATのみ陽性の抗体群(71例)についての解析では, 免疫グロブリンアイソタイプがIgG1主体(85%)で抗体感作量が高く, MMAの陽性率が高い(87%)ことから, 臨床的意

義が高いと報告してきた<sup>5)</sup>。今回は生食法, 酵素法のみで検出された抗体(C群)のみ性状解析を行ったが, 検出された抗Lewisおよび抗Mは, アイソタイプはすべてIgMであった。一方, 抗EのアイソタイプはIgG1やIgG3が検出されたものの, C群の抗体はすべてMMA陰性の低力価抗体であった。MMAの食食率と抗体の臨床的意義の関係について, Arndtら<sup>8)</sup>は溶血性輸血副作用のリスクを予測するためのカットオフ値を報告しており, 食食率が0～5%であれば, 溶血性輸血副作用のリスクはないと報告している。今回の検討で, C群のMMAの食食率はいずれも0～5%の陰性を示したことから, C群の抗体の臨床的意義は非常に低いと考えられた。臨床的意義の高い抗体はIAT(IH-1000)にて検出可能であったことから, PK7300での不規則抗体スクリーニング(生食法および酵素法)を廃止しても, 輸血用血液の安全性は確保できると示唆された。

酵素法は非特異反応が多く, 欧米では不規則抗スクリーニングに酵素法を使用することに否定的である<sup>12), 13)</sup>。また, 輸血療法の実施に関する指針<sup>4)</sup>や日本輸血・細胞治療学会の赤血球型検査(赤血球系検査)ガイドライン(改訂1版)<sup>9)</sup>では, 臨床的に意義のある不規則抗体のほとんどを検出できるIATを必須とし, 適切な条件下であればIATを単独で行うことができるとされているが, 酵素法の必要性については明言されておらず, 検出できる抗体も限定されることから, 酵素法を行う意

義は高くないと考えられている。しかしながら、我が国における酵素法の併用率は、約76%といまだに高い状況である<sup>14)</sup>。酵素法の利点の一つに初期のRh抗体の検出があげられているが、遅発性溶血性副作用の防止に有益であるとの確証は得られていない<sup>6)</sup>。さらに、臨床的意義の低い抗体の検出を避ける不規則抗体検査のあり方について国内でも議論されるようになり、それらの報告では、いずれも溶血性輸血反応の発生はなかったと報告している<sup>15), 16)</sup>。

受血者では、輸血による抗原感作によって一時的に消失した不規則抗体の抗体価が再上昇する可能性があるが、製剤に含まれている不規則抗体では再上昇を考慮する必要はない。また、輸血用血液の不規則抗体は、受血者の血液循環に入ると希釈されるため<sup>17), 18)</sup>、受血者に行っているような高感度検査や初期抗体の検出を考慮する必要性は少ない。血液センターでは従来より、プール法(5～10プール)とプール血球(2種)による不規則抗体スクリーニングが実施されてきたが、IH-1000によるIATは従来法と同等の検出感度であり<sup>19)</sup>、輸血用血液の不規則抗体が原因となった明らかな溶血性副作用の報告はされていない。以上のこと

から、生食法および酵素法を廃止しても安全性に問題はないと考えられる。

PK7300による不規則抗体スクリーニング(生食法および酵素法)を廃止した際のメリットとして、不規則抗体検査に係るコストの削減、二次検査の検体数減少の2つが挙げられる。試算をおこなうと当センターでは、不規則抗体スクリーニングに係る試薬および消耗品のコストが現在の年間2,639万円のうち約1,000万円(約36%)が削減でき(図1)、不規則抗体の二次検査数は現在の年間2,476本からIH-1000で陽性となる259本となり、約90%の検体数が削減され(図2)、検査業務の軽減化、効率化が図られることが分かった。

## 結 語

生食法および酵素法により検出された不規則抗体の臨床的意義は低く、臨床的意義の高い抗体はIAT(IH-1000)にて検出可能であった。PK7300の検査項目から生食法および酵素法による不規則抗体スクリーニングを廃止しても輸血用血液の安全性には影響を与えないと考えられることから、献血者血液の不規則抗体スクリーニングのあり方を見直す必要がある。

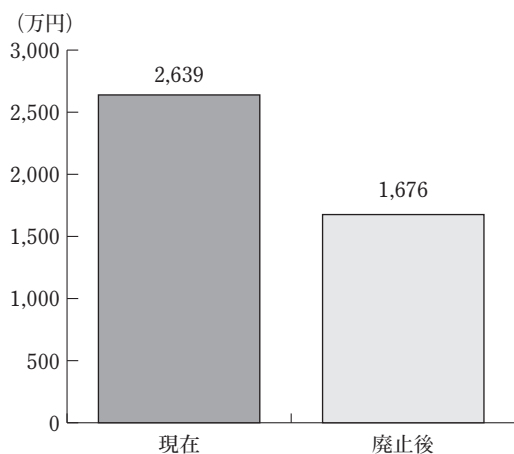


図1 北海道ブロック血液センターでの不規則抗体検査にかかる年間コストの変化

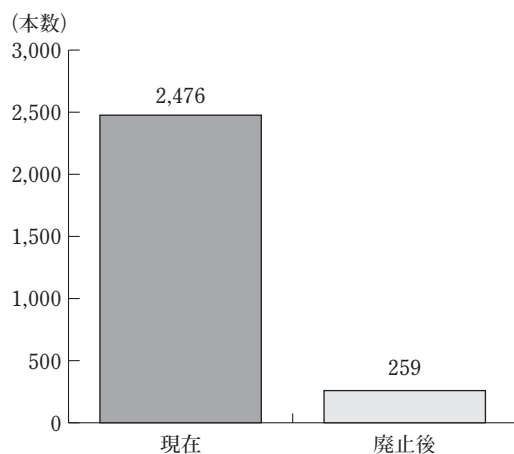


図2 北海道ブロック血液センターでの不規則抗体二次検査数の変化

## 文 献

- 1) 鈴木 由美：スタンダード輸血学テキスト，第2版，86，認定輸血検査技師制度議会カリキュラム委員会，医歯薬出版株式会社，東京，2008.
- 2) 内川 誠：輸血学 改定第3版，遠山 博ほか，403, 416，中外医学社，東京，2004.
- 3) 高橋 俊二：[輸血検査のすべて] 抗体スクリーニング，Medical Technology，31：1506-1509，2003.
- 4) 厚生労働省医薬食品局血液対策課：輸血療法の実施に関する指針(改定版)，2007.
- 5) 大橋 恒ほか：不規則抗体スクリーニングにおける酵素法の意義，日本輸血細胞治療学会誌，56：709-715，2010.
- 6) 石丸 健ほか：[今日から役立つ輸血検査業務ハンドブック] 酵素法のみ陽性の場合，Medical Technology，39：1402-1404，2011.
- 7) 三島 由祐子ほか：不規則抗体の検査法の比較検討，医学検査，62：661-665，2013.
- 8) Arndt PA, and George Garratty: A retrospective analysis of the value of monocyte monolayer assay results for predicting the clinical significance of blood group alloantibodies, Transfusion, 44: 1273-1281, 2004.
- 9) 赤血球型検査(赤血球系検査)ガイドライン改訂タスクフォース：赤血球型検査(赤血球系検査)ガイドライン(改訂1版)，日本輸血細胞治療学会誌，60：巻末13(会告VII)，2014.
- 10) Poole J, Danniels G: Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine, Transfus Med Rev, 21: 58-71, 2007.
- 11) American Association of Blood Banks (AABB): Technical Manual (17th ed.), AABB, Bethesda, 2011, 376-436.
- 12) Issit PD. *et al.*: Lack of clinical significance of “enzyme-only” red cell alloantibodies. Transfusion, 33: 284-293, 1993.
- 13) Champman JF. *et al.*: Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories, Transfusion medicine, 14: 59-73, 2003.
- 14) 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会：平成25年度日臨床臨床検査精度管理調査報告書 輸血検査部門，2014.
- 15) Okutsu M. *et al.*: Increased detection of clinically significant antibodies and decreased incidence of delayed haemolytic transfusion reaction with the indirect antiglobulin test potentiated by polyethylene glycol compared to albumin: a Japanese study, Blood Transfus, 9: 311-319, 2011.
- 16) 友田 豊ほか：冷式抗体保有患者への対応抗原陽性赤血球製剤輸血：多施設共同研究による冷式抗体の臨床的意義の評価，日本輸血細胞治療学会，59：733-739，2013.
- 17) Klein HG, Anstee DJ: Screening of the donor's plasma, Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, Rebecca Huxley, 11th edition, 328-329, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2005.
- 18) Issit PD, Anstee DJ: Antibody-Screening Tests on Donor Blood, Applied Blood Group Serology, 4th edition, 884-885, Montgomery Scientific Pubns, North Carolina, United State, 1998.
- 19) 大橋 恒：輸血用血液における血液型関連検査の向上，血液事業，34：167-168，2011.