

[報告]

PK7300で使用するABO血液型ウラ検査用コントロールの検討 および運用上の問題点について

日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター
齋藤智美, 松本理加, 橋本 香, 金子悦子, 小原久美,
五十嵐寛幸, 榎本隆行, 峰岸 清, 稲葉頌一, 中島一格

A control sera for anti-A, anti-B test using PK7300 and problems at maintenance

Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center
Satomi Saito, Rika Matsumoto, Kaori Hashimoto, Etsuko Kaneko,
Kumi Obara, Hiroyuki Igarashi, Takayuki Enomoto, Kiyoshi Minegishi,
Shoichi Inaba and Kazunori Nakajima

抄 錄

自動輸血検査装置PK7300でのABO血液型ウラ検査に用いるコントロールとして、抗A・抗B血液型判定用抗体[モノクローナル抗Aワコーと抗Bワコー]を抗体価16程度に希釈している自家調製コントロールはBSAで保存すると抗A抗体が失活することが明らかになった。そのため、これに代えて、和光純薬がオモテ検査用試薬として2010年から供給している希釈抗A・抗B血液型判定用抗体[モノクロ抗A試薬・PK(希釈)と抗B試薬・PK(希釈)]が、ウラ検査のコントロールとして使用できることを確認した。コストは高くなるが、各検査施設が標準化された抗体価を持つコントロールを使用することは検査精度の向上に有用と考えられた。また、現在血液事業本部が選択し、和光純薬から供給されているウラ検査用試薬(A血球・PKとB血球・PK)のロット間差について低力価抗体を使用したSPC値測定がA・B型抗原量を反映することを確認した。検査終了後の回路洗浄で、次亜塩素酸Na液による洗浄は抗A抗体を失活させることを認めたことから、検査終了後の回路洗浄に次亜塩素酸を用いた後は、CLEAN99Kで再度洗浄する必要があることを確認した。

Key words: PK7300, anti-A・anti-B, blood typing, quality control

はじめに

ABO血液型一次検査は2008年にPK7300 (BECKMAN COULTER) が本社整備され、2010年よりABO血液型一次検査で使用する試薬は和

光純薬に製造委託した試薬を使用し、全国統一の手順で実施されている。

SOPでは、コントロールが市販品抗A、抗Bを16倍程度の凝集価を示すように希釈すること

を求めていたが、オモテ検査用のモノクローナル抗体は1,000倍以上と抗体価が高いため、コントロールの調製ごとに抗体価に若干の差が生じる可能性がある。また我々は、希釈液にBSAを添加して保存すると抗A抗体が失活することを経験している。

今回、2010年から和光純薬よりオモテ検査用に供給が開始された[モノクロ抗A・抗B試薬・PK(希釈)]をウラ検査用コントロールとして使用し、SPC値^{*1}を検討したところ、満足できる結果が得られた。

ウラ検査用血球は、献血者由来の血液でA・Bの抗原性が強く、MおよびP₁抗原が陰性の血球を関東甲信越ブロック血液センターおよび近畿ブロック血液センターで選択し、和光純薬に製造依頼して、赤血球保存液で1.4%程度の血球浮遊液としたものが、各検査施設に供給されている。そのため、ウラ検査用の血球試薬は採血後5週間目(35日目)からしか使用できず、56日目までしか使用が認められていない。したがって、実際の使用許容期間は3週間と短く、A・B抗原量も同一ではないと思われる所以、日々、検査開始前にコントロールを用いて精度管理を行う必要がある。我々は、低力価抗体を使用したSPC値の測定がウラ検査用試薬のロット間の抗原量の違いを反映すると思われることを報告している¹⁾。さらに検査終了後の回路洗浄で、次亜塩素酸Na液による洗浄が抗A抗体を失活させることを認めたことから、検査終了後の回路洗浄に次亜塩素酸を用いた後は、CLEAN99Kで再度洗浄する必要性について確認を行った。

これらの検討結果について報告する。

対象および方法

- 調査期間：2013年4月から2014年3月までの1年間とした。
- 対象機器：PK7300
精度管理の対象としたPK7300は4台で各号機ごとに各血球試薬のSPC値を求めた。
- コントロールの調製
 - 自家調製コントロール：和光純薬のモノク

ローナル抗Aワコー(以下：抗Aワコー)およびモノクローナル抗Bワコー(以下：抗Bワコー)を、2倍および3倍希釈から倍々希釈を行い、抗体価が16倍程度で、PK7300でSPC値が1になる希釈倍率を求め、抗Aワコーを2%BSA添加PBSおよびPBS(pH7.0)単独で、抗Bワコーを同じく2%BSA添加PBSおよびPBS(pH7.0)単独で希釈した。10mLずつコントロール用試験管に分注し、4℃冷蔵保存で日々の検査開始時にコントロールとして用いた。測定は各号機につき12回以上行った。

- 検討用コントロール：抗体価16倍のモノクロ抗A・PK(希釈)[以下：抗A・PK(希釈)]、モノクロ抗B試薬・PK(希釈)[以下：抗B・PK(希釈)]をそれぞれ10mLずつ、コントロール用試験管に分注して使用した。測定は各号機につき10回以上行った。
- ウラ検査用血球試薬：和光純薬から供給されるA血球・PK、B血球・PKを用いた測定は、使用期限前3週間内に1日最低2回行った。調査期間中の試薬ロット数は18個であった。
- 回路洗浄液
 - 0.3%次亜塩素酸Na液
 - 0.25%CLEAN99K(クリーンケミカル)
 それについて、抗Aワコーと抗Bワコーを抗体価4倍および2倍に希釈して検討した。測定は1台のPK7300を用い洗浄前後で8回行った。

結果

1. 自家調製コントロールの希釈液の検討(図1-A, 図1-B)

抗Aワコーおよび抗Bワコーを抗体価4倍に希釈して、日々の始業時に測定を行い経時的変化を観察したところ、PBSで希釈した抗Aと抗B、2%BSA添加PBSで希釈した抗Bは100日間以上の追跡で変化が見られなかったが(図1-B)、2%BSA添加PBSで希釈した抗Aは30日から抗体価の低下が始まり、50日以降は急速に抗体価が低下した(図1-A)。

*1 SPC(Sharpness between peripheral and center)値：ウェル中心部の血球のエッジの明瞭さ、周辺部の血球のぼやけ方をCCDカメラ画像で処理し、数値化した値で、通常は陽性のときに小さい値、陰性のときに大きい値を示す。
今回検討を行った項目の陽性と陰性の閾値は10。

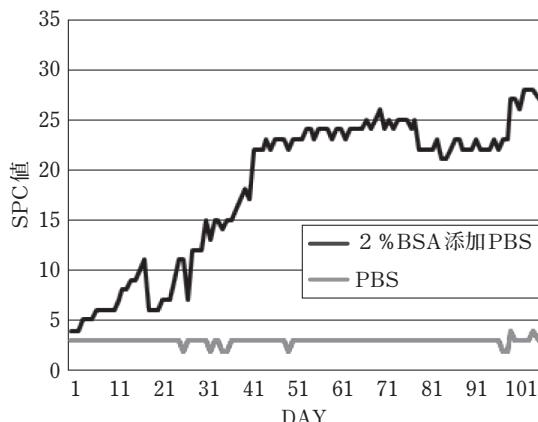


図1-A 抗A抗体の希釈液による影響

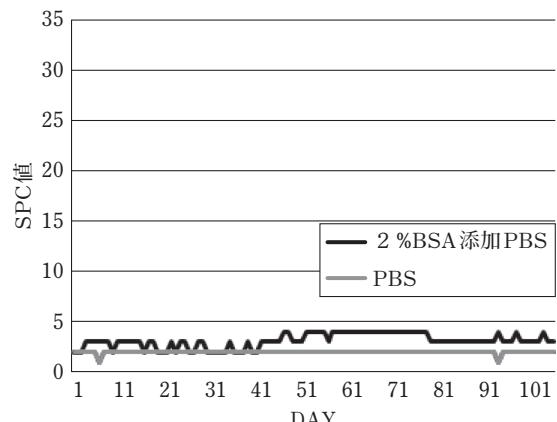


図1-B 抗B抗体の希釈液による影響

図1

表1

表1-A 自家調製コントロールのPK7300各号機ごとのSPC値

	最低値				最高値				平均値			
	1号機	2号機	3号機	4号機	1号機	2号機	3号機	4号機	1号機	2号機	3号機	4号機
A血球・PK 陽性コントロール	1	1	1	1	4	5	2	2	2.0(±0.1)	2.0(±0.2)	2.0(±0.1)	1.6(±0.5)
B血球・PK 陽性コントロール	1	1	2	1	2	2	2	2	2.0(±0.0)	2.0(±0.0)	2.0(±0.0)	1.8(±0.4)
A血球・PK 陰性コントロール	24	22	25	27	31	31	31	30	28.3(±1.1)	28.5(±1.2)	28.0(±1.5)	28.6(±0.8)
B血球・PK 陰性コントロール	23	23	25	30	33	33	32	32	29.6(±1.2)	29.8(±1.2)	29.1(±1.3)	30.7(±0.8)

表1-B 検討用コントロールのPK7300各号機ごとのSPC値

	最低値				最高値				平均値			
	1号機	2号機	3号機	4号機	1号機	2号機	3号機	4号機	1号機	2号機	3号機	4号機
A血球・PK 陽性コントロール	2	2	2	2	3	3	3	2	2.0(±0.0)	2.0(±0.0)	2.0(±0.1)	2.0(±0.0)
B血球・PK 陽性コントロール	2	2	2	2	4	3	4	2	2.0(±0.1)	2.0(±0.0)	2.0(±0.1)	2.0(±0.0)
A血球・PK 陰性コントロール	26	25	25	30	36	35	34	34	31.8(±1.2)	32.0(±1.2)	30.8(±1.4)	32.0(±0.7)
B血球・PK 陰性コントロール	26	24	28	32	36	36	35	34	32.3(±1.6)	32.5(±1.7)	31.7(±1.8)	33.0(±1.2)

2. PK7300各号機ごとの検討(表1-A, 表1-B)

a) 自家調製コントロール

A血球・PKと陽性コントロールのSPC値は, 1号機が1~4 (2.0±0.1), 2号機が1~5 (2.0±0.0)

±0.2), 3号機が1~2 (2.0±0.1), 4号機が1~2 (1.6±0.5), B血球・PKと陽性コントロールのSPC値は, 1号機が1~2 (2.0±0.0), 2号機が1~2 (2.0±0.0), 3号機が2 (2.0±0.0)

0.0), 4号機が1~2 (1.8±0.4) であった。

A血球・PKと陰性コントロールのSPC値は, 1号機が24~31 (28.3±1.1), 2号機が22~31 (28.5±1.2), 3号機が25~31 (28.0±1.5), 4号機が27~30 (28.6±0.8), B血球・PKと陰性コントロールのSPC値は, 1号機が23~33 (29.6±1.2), 2号機が23~33 (29.8±1.2), 3号機が25~32 (29.1±1.3), 4号機が30~32 (30.7±0.8) であった。

抗Aワコー, 抗BワコーとともにPK7300の号機に関わらず一定の値を示し, コントロール不成立は発生しなかった (表1-A)。

b) 検討用コントロール

A血球・PKと陽性コントロールのSPC値は, 1号機が2~3 (2.0±0.0), 2号機が2~3 (2.0±0.0), 3号機が2~3 (2.0±0.1), 4号機が2 (2.0±0.0), B血球・PKと陽性コントロールのSPC値は, 1号機が2~4 (2.0±0.1), 2号機が2~3 (2.0±0.0), 3号機が2~4 (2.0±0.1), 4号機が2 (2.0±0.0) であった。

A血球・PKと陰性コントロールのSPC値は, 1号機が26~36 (31.8±1.2), 2号機が25~35 (32.0±1.2), 3号機が25~34 (30.8±1.4), 4号機が30~34 (32.0±0.7), B血球・PKと陰性コントロールのSPC値は, 1号機が26~36 (32.3±1.6), 2号機が24~36 (32.5±1.7), 3号機が

28~35 (31.7±1.8), 4号機が32~34 (33.0±1.2) であった。

抗A・PK (希釈), 抗B・PK (希釈) とともに, 自家調製コントロールと差がなかった (表1-B)。

3. 検討用コントロールと血球試薬のロットごとの検討 (図2-A, 図2-B)

検討用コントロールと18ロットの血球試薬とのSPC値はA血球・PKと陽性コントロールが2~3, 陰性コントロールが25~36であった (図2-A)。

B血球・PKと陽性コントロールが2~4, 陰性コントロールが28~36でロットに関わらず, 陽性・陰性の判定は明確であった (図2-B)。

4. 抗体価を2倍と4倍に調製したコントロール (図3-A, 図3-B)

抗体価4倍のSPC値は, A血球・PKが2~3, B血球・PKが2~4とほぼ安定していたが, 抗体価2倍でのSPC値は, A血球・PKでのロットごとの平均値が3~19, B血球・PKでは5~16で血球ロットごとにSPC値が大きく変動していた。

5. 回路洗浄液の検討 (図4-A, 図4-B)

測定終了後に0.3%次亜塩素酸Na液で流路を洗

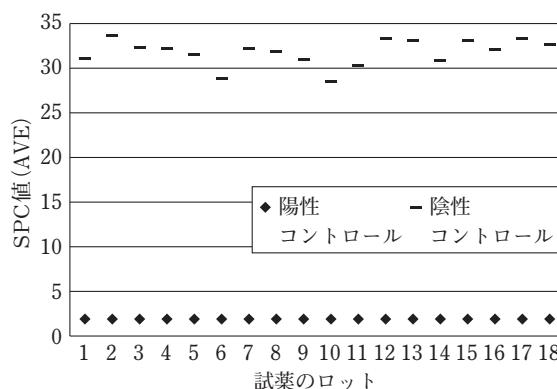


図2-A 検討用コントロールのA血球・PKロットごとのSPC値

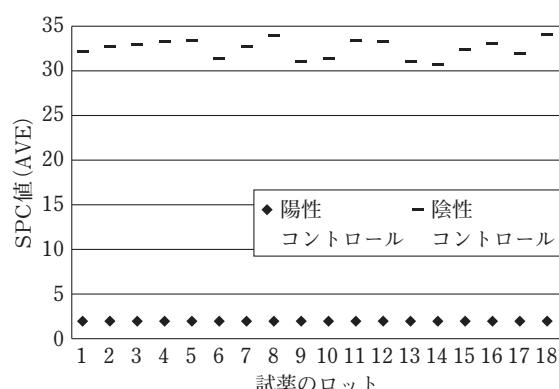


図2-B 検討用コントロールのB血球・PKロットごとのSPC値

浄すると、翌日の検査で抗体価4倍のSPC値がA血球・PKは2、B血球・PKは2~6、抗体価2倍では、A血球・PKが14~26、B血球・PKが7~10と抗Aが陽性の下限~陰性を示した。

CLEAN99Kで洗浄を行うと、翌日の検査で抗体価4倍のSPC値がA血球・PKは3、B血球・PKは2~3、抗体価2倍では、A血球・PKが7~9、B血球・PKが8~10と洗浄液によるSPC値への影響がなくなった。

考 察

PBSと2%BSA添加PBSの2種類の希釈液

を用いて自家調製コントロールの抗体価を4倍程度に調製し、日々の精度管理に用いていたところ、2%BSA添加PBSで希釈した抗Aワコーの抗体価が30日目を境に低下し、50日目からは急速に低下した。

PBSで希釈した抗Aと抗B、および2%BSA添加PBSで希釈した抗Bでは100日以上抗体価に変化を認めなかった(図1)。

抗Aでの抗体価の低下はPBS単独では認められないことからBSAに由来すると考えられたが、抗原抗体反応と考えるには時間が経ち過ぎているので原因は不明である。

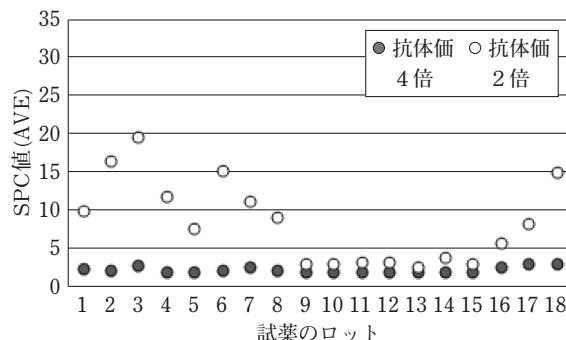


図3-A 抗体価2倍と4倍に調製したコントロールのA血球・PKロットごとのSPC値

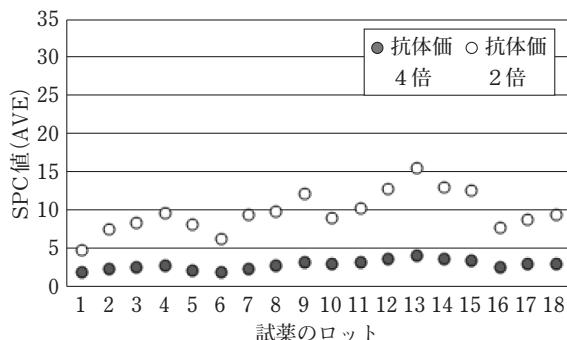


図3-B 抗体価2倍と4倍に調製したコントロールのB血球・PKロットごとのSPC値

図3

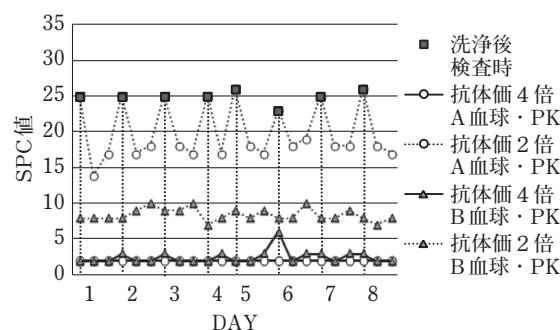


図4-A 0.3%次亜塩素酸ナトリウム液洗浄後のA・B血球・PKのSPC値

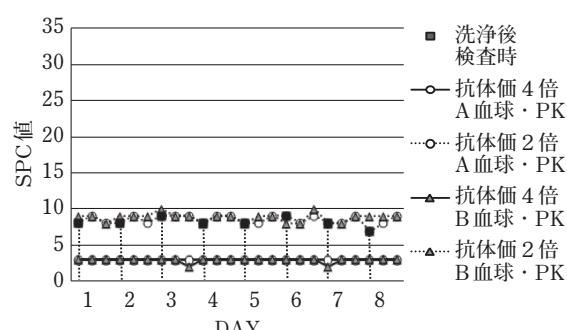


図4-B CLEAN99K洗浄後のA・B血球・PKのSPC値

図4

今回の検討の主たる目的であったウラ検査用のコントロールとして、自家調製コントロールと検討用コントロールを4台のPK7300で検討したところ、SPC値は同等であった。また、抗血清に色付けされている青色(A型)と黄色(B型)は十分に希釈されておりPK7300の判定に影響を与えたかった(表1・図2)。

ウラ検査のコントロールを自家調製コントロールから検討用コントロールに変更するとコスト的には10倍程度となるが[抗A、Bワコー1,300円、抗A、B・PK(希釈)15,000円]、抗体価の安定したコントロールの供給を受けることができ、全検査施設で共有できる点で有利であると考えている。

ウラ検査で使用するA血球・PKとB血球・PKは、本来CPD全血を用いるべきであるが、わが国では安定的に血球を入手するためにMAP加赤血球で照射済みのものを用いている。これによって、全血由来血球よりも血漿が少なくMAP液が添加された状態で保存され、さらにX線照射された血球を用いるので、試薬血球の使用可能期限が、通常のAlserver保存の、採血後8週間でよいのか確認を行った。その結果、18ロットの血球について、採血後56日目の血球での、判定は明確であり問題なく使用できると考えられた(図2-A・図2-B)。

抗体価2倍および4倍の抗Aワコーと抗BワコーでA血球・PKおよびB血球・PKのロット間

差を検討したところ、4倍では抗A、抗Bとともに明確な陽性で、SPC値の変動が小さかったが、2倍でのSPC値の平均値がロットによってA血球・PKが3~19、B血球・PKが5~16の範囲に広がった。

我々は、この原因をロットごとのA・B抗原量の差を反映していると考えて報告した¹⁾。抗体価2倍に希釈した抗Aと抗Bを用いたSPC値の測定は、血球の抗原量が十分存在することを確認する精度管理の一つとして有用と思われた(図3-A・図3-B)。SPC値が大きい血球試薬はPKの再検率が高い時の原因のひとつと考えている。

検査終了後の回路内洗浄を、0.3%次亜塩素酸Na液単独で行うと、次回の測定開始時に抗体価を2倍に調製した抗Aの反応が陰性化することが判明した。抗体価の低い抗Aが次亜塩素酸Naによって変性するためと考えている(図4-A)。この変性はCLEAN99Kで再洗浄することで解消された(図4-B)。

洗浄液中の次亜塩素酸Naの濃度が0.3%から0.0025%未満とおよそ1/120になったためと考えられた。一方、抗Bが次亜塩素酸Naの影響を受けない理由はPBSにBSAを添加していることと考えている。

今回の検討でPKのウラ検査用コントロールに和光純薬から供給されるオモテ検査用試薬のモノクロ抗A・抗B試薬・PK(希釈)が有用であると確認できた。

文 献

- 1) 松田充俊、清水輝恵、金子悦子ほか:PK7200で使用する自家調整血球試薬の調製方法について。

血液事業 30:381. 2007. 第31回自己血輸血学会総会(高松)