

シンポジウム2

直接抗グロブリン試験陽性赤血球製剤は輸血できるのか？

シンポジウム2

直接抗グロブリン試験陽性化の機序と臨床

亀崎豊実(自治医科大学地域医療学センター)

直接抗ヒトグロブリン試験 (DAT) は、赤血球上のIgGもしくは補体成分を検出する検査法であり、自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) の9割以上でDAT陽性を示し、溶血性貧血の診断においては、免疫性溶血と非免疫性溶血の鑑別に利用されている。

AIHAの有病率は3～10/100万人と報告されている¹⁾。一方、献血者におけるDAT陽性の頻度は1,000～14,000人に1人であり、この中でAIHA患者は1.6%と報告されている^{2)～4)}。また、入院患者の7～8%にDAT陽性が認められ、DAT陽性入院患者の1.4%がAIHAであり、DAT陽性溶血性貧血患者では83%がAIHAであった⁴⁾。溶血の存在を前提としなければ、DAT陽性のみで免疫性溶血を予見する意義は少ない。

赤血球製剤は健常献血者由来であり、溶血性疾患を有しないことが大前提になるが、間接クームス試験 (IAT) 陰性のAIHA患者が代償性溶血状態にあれば、献血時の検査として貧血検査 (Hb)、肝機能検査 (GPT)、血型の表裏試験、不規則抗体スクリーニングではチェックされず、交差適合試験主試験でIAT陽性となり、供血者赤血球DAT陽性と判定される可能性はある。本稿では、AIHA研究者の立場から、「DAT陽性赤血球製剤が受血者の生体内で溶血するか? (DAT陽性因子と溶血決定因子)」について述べたい。

DAT陽性化に関わる要因としては、赤血球結合IgG量が最も重要であり、試験管法では200 (IgG分子/赤血球) 以上、カラム法では100以上の結合で陽性を示すことが多い¹⁾。一方、免疫性溶血を決める因子としては、IgGサブクラスが重要であり、IgG₁であれば1,180以上、IgG₃であれば180以上の結合で溶血をきたすとされている⁵⁾。このことから、IgG₁のみの結合であればDAT陽性 (試験管法) でも溶血をきたさない場合があり、IgG₃であればDAT陰性でも溶血をきたすことが予想される。また、IgG₂やIgG₄であればマクロファージFcレセプター (FcR) への結合力が極めて弱いため、

DAT陽性でも溶血をきたさないが、溶血のないDAT陽性赤血球上に検出されるIgG₄の頻度はIgG₁の1割程度である²⁾。因みに、カラム法DATは試験管法より感度が高く、溶血可能な最少IgG₃量であっても検出可能と思われるが、補体が赤血球に結合するとオプソニン効果によりマクロファージ貪食能が10倍以上に増強されることから、赤血球結合IgG 78分子/赤血球をカットオフ値とするカラム法DAT陰性AIHAの可能性は留保される⁵⁾。

DATの偽陽性の要因については、高ガンマグロブリン血症による非特異的なIgG結合がよく知られており、原因として肝疾患や免疫グロブリン製剤の使用、多発性骨髄腫などがある²⁾。また、thalassemia患者の半数に溶血を伴わないDAT陽性が認められており、陽性化の要因としてHCV感染症と高ガンマグロブリン血症が報告されている⁶⁾。非特異的なIgG結合はIgGのFc構造変化をきたさないことからFcRへの結合が弱く、結合してもFcレセプターの架橋ができないため貪食されにくい。

DAT陽性供血者の予後については、5～10%にAIHA発症し、20～25%はDAT陰性化し、60～70%ではDAT陽性は持続し血液学的に正常との報告もあるが³⁾、平均5.5年の観察期間に癌、とくに血液腫瘍 (リンパ腫、骨髄腫) の発症頻度が優位に高く、相対危険は癌で2.14、血液病は8.03であり、DAT陽性供血者本人への注意喚起が必要とする報告もある⁷⁾。また、保存血液でのDAT陽性化も報告されている。C3b自己活性化による補体C3bの赤血球上への蓄積により、3週間保存されたEDTA血ではC3d結合量が2倍に増加していた²⁾。24時間保存した血液の91%に非特異的なIgG吸着が検出され洗浄により陰性化するが、低親和性自己抗体の可能性もあるため注意を要する³⁾。

「DAT陽性赤血球製剤が受血者の生体内で溶血するか?」への単純な回答は現時点では困難であ

り、個々の事例において、洗浄や解離法による偽陽性の鑑別、フローサイトメトリー法や特殊クームス抗体によるIgGサブクラスの同定、マクロファージによる貪食試験などによる溶血予想と検証結果を蓄積する必要がある。また、コスト的に可能であれば、献血時のDAT施行やAST, LDH検

査による溶血状態の事前チェックも有効な対策かもしれない。補体のみのDAT陽性については、通常、赤血球上でC3bからC3d(g)へと不活化され貪食されないことから、問題ないのではないかと考える。

文 献

- 1) 金倉譲, 亀崎豊実, 梶井英治, 他. 自己免疫性溶血性貧血 診療の参照ガイド(平成28年度改訂版), 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 特発性造血障害に関する調査研究班(研究代表者 荒井俊也), 2017.
http://zoketsushogaihan.com/file/guideline_H28/07.pdf
- 2) Klein HG, Anstee DJ. Harmless warm autoantibodies; in Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 12th Edition. Wiley-Blackwell, 2014, pp268-270.
- 3) Hannon JL. Management of blood donors and blood donations from individuals found to have a positive direct antiglobulin test. Transfus Med Rev. 2012; 26: 142-52.
- 4) Meulenbroek EM, Wouters D, Zeerleder SS. Lyse or not to lyse: Clinical significance of red blood cell autoantibodies. Blood Rev. 2015; 29: 369-376.
- 5) 亀崎豊実. 自己免疫性溶血性疾患の診断と治療の進展. 臨床血液. 2017 ; 58 : 329-335.
- 6) Arinsburg SA, Skerrett DL, Kleinert D, *et al.* The significance of a positive DAT in thalassemia patients. Immunohematology. 2010; 26: 87-91.
- 7) Rottenberg Y, Yahalom V, Shinar E, *et al.* Blood donors with positive direct antiglobulin tests are at increased risk for cancer. Transfusion. 2009; 49: 838-842.

シンポジウム2

直接抗グロブリン試験陽性時の解釈と医療機関における輸血対応について

丸山美津子(三重大学医学部附属病院輸血・細胞治療部)

【はじめに】

直接抗グロブリン試験 (direct antiglobulin test : DAT) は、患者赤血球に抗体あるいは補体が結合しているかどうかを確認する検査であり、抗原抗体反応があれば、溶血の原因として疑われる。DAT陽性の意義は、自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) または同種免疫の溶血性輸血副作用や胎児新生児溶血性疾患の診断、また、移植臓器内のドナーリンパ球によって産生された抗体で患者赤血球が感作された場合、血漿分画製剤の投与によりγグロブリン内に含まれる抗体で患者赤血球が感作された場合、そして、抗生物質など薬剤起因性の免疫性溶血性貧血の診断に有用な検査である。したがって、疾患名・溶血所見の有無・輸血歴・妊娠歴・移植歴・薬剤などの患者情報が重要となる。しかし、日常検査で遭遇するDAT陽性患者の中には、溶血所見を認めない症例も散見される。医療機関の検査室では、自己抗体を保有する患者の確認事項として血漿中に同種抗体が隠れていないか、溶血所見がないか、溶血所見がある場合は、自己抗体の特異性について調べている。とくに免疫能が亢進しているAIHA患者の赤血球輸血は、①同種抗体の有無、②Rh表現型の一致／適合、③自己抗体の特異性を加味して赤血球製剤を選択する。

今回のシンポジウムのテーマは、“DAT陽性赤血球製剤は輸血できるのか”である。医療機関では交差適合試験主試験 (間接抗グロブリン試験) 陽性となるため、通常は不適合と判定される。このような場合、輸血しても安全と言えるのであろうか？

【目 的】

今回、当院におけるDAT陽性患者の解析結果と輸血効果、DAT陽性RBCの対処について提示し、最後にDAT陽性RBCを輸血してよいのか？というシンポジウムのテーマについて、医療機関の立場から考察する。

【対象と方法】

2010年4月から2015年3月までに実施したDATを含む不規則抗体検査、33,817件のうち、DAT陽性61件 (陽性率0.18%)、患者34例について年齢、性別、疾患、溶血所見、DAT・間接抗グロブリン試験 (IAT) の結果、血漿中に自己抗体を認めた5症例の輸血効果を解析した。

【結 果】

男女比15 : 19、年齢7カ月～80歳 (中央値64、母児血液型不適合5例を除く)、疾患は自己免疫疾患 : 18例、母児血液型不適合 : 5例、その他 : 11例であった。DAT陽性61件中自己抗体の検出は14件、同種抗体の共存は1件あった。溶血所見は61件中15件 (24.6%) であった。溶血所見がなくても、DATの凝集強度はw+から4+まで幅広く見られ、DATがw+、1+と弱くても溶血所見がある症例もあった (表1)。溶血所見ありの自己抗体6症例は、すべて温式AIHAの患者であった。赤血球輸血は5例で実施しており、AIHA症例1例を含め、5例ともヘモグロビン濃度が上昇した (表2)。

【まとめ・考察】

DAT陽性患者34名のうち18名 (53%) が自己免疫疾患であり、赤血球膜に結合する自己抗体が関係していた。溶血所見とDAT凝集強度の比較において、強度に関係なく溶血の有無が認められた。溶血所見とIAT結果において、溶血を認めた14例のうち6例はAIHA (合併含む) で、血漿中にも自己抗体を認めた。赤血球輸血を実施した5症例では、溶血性輸血副作用を認めず、ヘモグロビン濃度が上昇したことから、輸血効果があったと考えられる。

【DAT陽性RBCは輸血できるのか】

当院では、赤血球製剤がDAT陽性であった場合、

表1 溶血所見とDAT結果の比較

溶血所見	DAT凝集強度	件数	溶血所見	DAT凝集強度	件数
無	w+	9	有	w+	2
	1+	6		1+	5
	2+	18		2+	4
	3+	10		3+	4
	4+	3		4+	0

N=61, DATは多特異性抗ヒトグロブリン血清(オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス)を使用。

表2 輸血効果

Case	RBC	Hb濃度(g/dL)		LDH(IU/L)		T-Bil(mg/dL)	
	単位数	輸血前	輸血後	輸血前	輸血後	輸血前	輸血後
1	2	3.1	4.2 ↑	323	290 ↓	14.1	11.7 ↓
2	2	6.4	8.9 ↑	122	196 ↑	1.8	2.6 ↑
3	2	6.6	8.6 ↑	83	97 ↑	0.3	0.5 ↑
4	4	5.8	7.0 ↑	210	169 ↓	0.4	未検査
5	2	7.3	8.4 ↑	292	289 ↓	未検査	未検査

血液センターへ返品している。2010年4月から2017年10月までにDAT陽性RBCの返品はなかったが、一部の症例はT&Sを運用しているので、DAT陽性RBCが輸血されている可能性がある。交差適合試験済みのパイロットチューブ300本のDATを実施したが、すべて陰性であった。DAT陽性の献血者や健常者の予後に関して、DAT陽性献血者はDAT陰性献血者に比べ造血器腫瘍の発生リスクが高くなるとの報告やDAT陽性の健常人32名における追跡期間中に、1名のみ温式AIHAを発症したとの報告がある。

本テーマを証明するためには、DAT陽性血の安全性と有効性を考慮した臨床試験が必要ではないだろうか。ここで2つの問題を提起したい。

- ①検査上の問題点として、交差適合試験(IAT)で主試験陽性に対する医師への説明
- ②臨床上の問題点として、DAT陽性RBCの輸血効果や安全性に対する医学的根拠

2000年に国際輸血学会総会で採択された献血と輸血に関する倫理綱領には、患者は可能な限り、臨床的に適正で最善の安全性を提供できる成分製剤のみを投与されるべきであると記載されており、また、輸血療法は登録された医師の全責任のもとにおいて行わなければならないと記載されている。つまり、DAT陽性あるいは交差適合試験主試験陽性のRBC使用について、医師への説明と同意が必要であることが想定できる。

医師への説明と同意を得るためには、やはりDAT陽性RBCの安全性と輸血効果に関するデータが必要であると考え、血液法における医療関係者の責務として、血液製剤の適正使用と安全性に関する情報収集や提供に努めなければならない。

DAT陽性RBCの安全性に関しては、科学的、そして制度的に、課題が多く、すぐには解決できないテーマであるが、今回、考える良い機会となった。

参考文献

- 1) 赤血球型検査ガイドライン(改訂2版)日本輸血・細胞治療学会 赤血球型検査ガイドライン改訂タスクフォース 2016.
- 2) スタンダード輸血検査テキスト第3版, 医歯薬出版株式会社, 2017.

- 3) 輸血・移植検査技術教本, 丸善出版株式会社, 2016.
- 4) Mark. Fung, *et al.*: AABB TECHNICAL MANUAL 18th.
- 5) 菅野直子ほか, 直接抗グロブリン試験用カセット(DAT/IDATカセット)の検討, 機器・試薬26(4),

2003.

- 6) D. W. Gorst, *et al.*: Positive Direct Antiglobulin Test in Normal Individuals, *Vox Sang*, 38: 99-105, 1980.
Yakir Rottenberg, *et al.*: Blood donors with positive direct antiglobulin tests are at increased risk for cancer, *TRANSFUSION* Volume 49, May 2009.
- 7) 近江俊徳ほか, 温式自己免疫性溶血性貧血患者における赤血球結合IgG量の測定とその意義, 日本輸血学会誌38(5): 601-606, 1992.
- 8) 日本赤十字社 ホームページ
<http://www.jrc.or.jp/activity/blood/grap>

シンポジウム2

直接抗グロブリン試験陽性赤血球の臨床的意義

伊藤正一(日本赤十字社東北ブロック血液センター)

1 はじめに

直接抗グロブリン試験(以下、DATと略す)は、主に抗赤血球自己抗体(以下、自己抗体と略す)、補体及びγグロブリン等が赤血球に感作(結合)した場合に陽性となる。抗体感作赤血球の生体内での破壊メカニズムは、主に脾臓でのマクロファージによる貪食(血管外溶血)である。自己免疫性溶血性貧血(以下、AIHAと略す)は自己抗体によって感作された患者赤血球が体内で破壊され極度の貧血に陥る代表例である。一方、AIHA以外の患者及び献血者から検出されるDAT陽性例の多くは検査上のみの問題であり、DAT陽性が原因で溶血を伴う例は少ない。今回、献血者から検出されるDAT陽性例について検討した。

2 赤血球製剤のDAT陽性苦情数およびDAT陽性例の性状

2016年度の一年間に全国で供給された赤血球製剤は3,284,104本であり、このうちDAT陽性の苦情は、全国で499本(0.015%)であった。供給数から算出すると、赤血球製剤の6,581本に1本の割合であった。実際は、献血者から検出されるDAT陽性例はその数倍に及んでいる。これは、再来献血者において前回検査履歴(DAT陽性履歴)のある献血者は再度検査を実施し、DAT陽性の場合は検査不合格としているためである。その数は全国で年間2,700件程度になる。つまり、前回検査履歴を考慮しなかった場合は、年間3千本余りがDAT陽性苦情となる可能性がある。それを500本程度に抑えているのは、検査履歴を活用している効果といえる。

通常、DATは試験管法による判定が主流であるが、近年ゲルカラム凝集法(以下、カラム法と略す)を原理とした自動検査機器による検査も行われている。とくに医療機関ではカラム法を使用している施設も多くなりつつある。カラム法は試験管法よりも少ない抗体結合量の赤血球(DAT陽性赤血

球)を検出する特徴がある。赤血球上には抗体以外にも血清中のγグロブリン等が非特異的に結合している場合があり、カラム法は試験管法よりも感度が高いため、自己抗体以外の原因によるDAT陽性例も検出する傾向がある。また、DAT弱陽性(w+~1+)の判定は、検査方法、使用する抗ヒトグロブリン試薬及び赤血球浮遊液濃度の違いで試験管法とカラム法の結果が食い違う場合(陰性と弱陽性)がある。苦情製剤499例を試験管法で再検査した結果、DATの反応強度は、陰性が35例(7.0%)、w+が200例(40.1%)、1+が159例(31.9%)、2+が88例(17.6%)、3+が16例(3.2%)、4+が1例(0.2%)であり、全体の72%はw+~1+の反応強度であった。DATがw+~1+の359例のうち、175例について調査した結果、98例(56%)が赤血球抗体以外によるDAT陽性例であった。これらはセグメント内の血漿中に存在するγグロブリン等が非特異的に結合したものと考えられる。また、DATが3+以上の強陽性の多くは自己抗体が赤血球に感作したものである。通常DATが3+以上になるほとんどの例では、血清中にも自己抗体が出現し、原料血液検査の不規則抗体検査で不合格となるため、DAT陽性苦情品の中で3+以上の例は少ない。これが献血者から検出されるDAT陽性例の特徴である。

3 患者群におけるDAT陽性例の性状

東北地区の医療機関からDAT陽性のため不規則抗体精査目的で依頼された734例を対象としてDAT陽性例の性状を集計した。その結果、534例(72.8%)が温式自己抗体によるもの、165例(22.4%)が患者血清中のγグロブリン、免疫複合物等が非特異的に自己赤血球に結合したもの、残り35例(4.8%)は同種抗体が輸血した赤血球へ結合した例(遅発性血清学的輸血反応：DSTR)であった。温式自己抗体がDAT陽性の原因だった534例中、AIHA及びその疑い例は73例であった。つまり、

温式自己抗体によって自己赤血球が破壊されていく病的な要因でDATが陽性となっていたのは、13%程度であった。残りの461例はDATが陽性であっても、生体内で溶血が起こっていない。また、患者群のDATの反応強度は、2+以下は389例(53.0%)、3+以上は345例(47.0%)であった。これが患者群におけるDAT陽性例の特徴である。

4 単球を用いたDAT陽性赤血球の貪食試験

不規則抗体(同種抗体)による赤血球溶血の代表的なメカニズムは、マクロファージに貪食されることによる血管外溶血である。ただし、貪食には、赤血球への抗体結合量、抗体のIgGサブクラス及び補体結合量が重要なファクターとなる。

我々は、*in vitro*の実験系で通常の赤血球へ自己抗体解離液を人工的に感作し、その抗体結合量及びIgGサブクラスと貪食の関連について検討した。その結果、128倍以上の自己抗体で赤血球を感作した場合に貪食率が上がることで、自己抗体のIgGサブクラスがIgG2のみの場合は、128倍以上の抗体価であっても貪食されないことを明らかにした。

次に、献血者及び患者から検出されたDAT陽性赤血球を試料とした貪食実験を行った。DAT陽性赤血球を試料とすることは、より生体内に近い実験である。結果を図1に示す。DATが2+程度の

場合、赤血球抗体解離液中の抗体価は32倍前後である。一方、献血者のDAT陽性例の72%がw+~1+であり、これらの赤血球には抗体価が4~8倍の自己抗体が感作している。この程度の抗体感作量では、今回実施した貪食試験では貪食率は低値であった。患者群においても同様であった。

一方、患者群で見られるDATが4+の群では、解離液の抗体価も128倍以上と高く、これらのDAT陽性赤血球では、貪食率が60%(暫定的に陽性としている)を超える例が多数確認された。

5 まとめ

自己抗体が原因のDAT陽性患者では、DAT陽性赤血球が絶えず体内を循環しているがすべてのDAT陽性赤血球が速やかに体内で破壊されているわけではない。一定以上の抗体が赤血球に結合した際に、徐々に貪食される。そして、そのような症状を呈するのはAIHAなどの病的な例の一部であり、多くはDAT陽性であるにも関わらず溶血所見は観察されない。一方、血液製剤のDATが陽性でその血液を輸血した際のリスクを考えた場合、献血者のDAT陽性苦情の96.6%が2+以下の弱陽性であることから、輸血した血液が直ぐに壊される(貪食される)可能性は極めて低いと考える。しかし、現状では交差適合試験が陽性になること、DAT陽性の赤血球製剤を輸血しても通常の製剤と

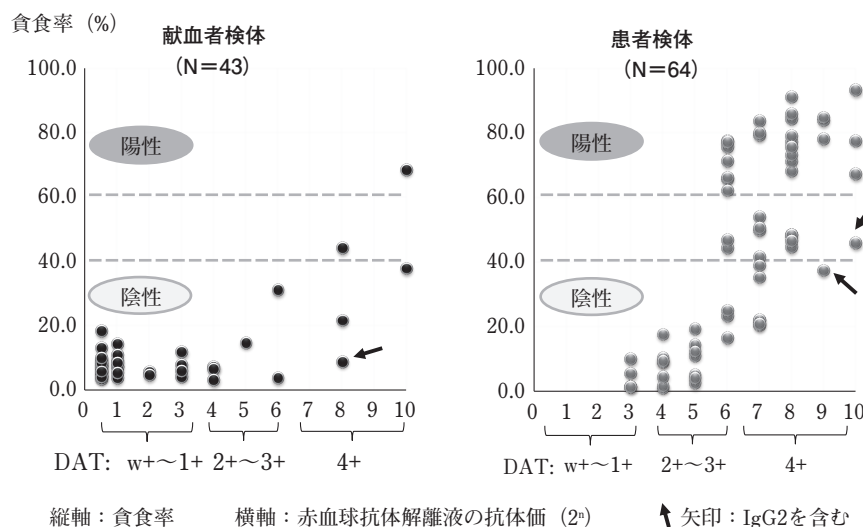


図1 DAT陽性赤血球の貪食率の比較

同等の輸血効果が得られることおよびDAT陽性赤血球製剤に起因する溶血を否定するエビデンスが

ないこと、これらがDAT陽性赤血球製剤を使用しても問題ないと言い切れない理由となっている。