［原著］

PK7300による血液型検査における
マイクロプレートの目視確認の意義

日本赤十字社北海道ブロック血液センター[1)]，北海道赤十字血液センター[2)]
木谷紗祐梨[1)]，三浦佳乃[1)]，宮崎　孔[1)]，佐藤進一郎[1)]，生田　克哉[2)]，紀野修一[1)]

Significance of visual confirmation of microplates in blood typing using PK7300

Japanese Red Cross Hokkaido Block Blood Center[1)],
Hokkaido Red Cross Blood Center[2)]
Sayuri Kiya[1)], Yoshino Miura[1)], Toru Miyazaki[1)],
Shinichiro Sato[1)], Katsuya Ikuta[2)] and Shuichi Kino[1)]

抄　　録

自動輸血検査装置PK7300（以下PK）を用いたABO・RhD血液型一次検査では，マイクロプレート（以下プレート）を用い凝集反応像を自動判定している。現在，プレートウェルに異物混入があると誤判定が起きる可能性があるため目視確認を行っているが，実際に異物混入が起きた場合は，大半はPKの自動判定で保留となっている。目視確認にはデメリットも多いため，今回我々は目視確認の必要性を検証した。PKにて異物混入や分注不良と判定された例を解析すると，まれに異物により偽陰性を呈することがわかった。この偽陰性は，測光値のひとつであるP値が真の陰性よりも低値であった。このため，P値を判定に利用するとRhD検査では偽陰性の防止が可能となり，目視確認を廃止できると考えられた。ABO検査では，P値による抗A・抗B試薬の偽陰性の判別は困難だが，血液型誤判定は非常にまれであり，プレート確認をPKの判定と1名の目視に簡略化することは可能と考えられた。

Abstract

In the ABO/RhD primary blood group test using the automatic blood transfusion tester PK7300 (PK), the reaction image is automatically judged using a microplate (plate). If there is contaminations on the plate, the judgment may be wrong, so each plate is visually checked. However, if a foreign matter contamination actually occurs, the automatic judgement is usually be pending in most cases. Therefore, we verified the necessity of visual check. An analysis of the PK judgment results for cases of contamination or poor dispensing revealed that false negatives were caused by foreign matter in rare cases. In addition, in these false negatives, it was revealed that the P value, which is one of the photometric values, was lower

論文受付日：2020年11月13日
掲載決定日：2021年3月18日

than the true negative value. By using the P value for judgment, it is possible to prevent false negatives in the RhD test, so it was considered that visual check could be omitted. In the ABO test, it is difficult to determine the false negatives of the anti-A and anti-B reagents by the P value, but the blood group misjudgment is extremely rare, and it is possible that plate check can be simplified to PK determination and visual check by one person.

Key words: PK7300, blood typing, ABO blood group, RhD blood group, マイクロプレート

【緒　言】

原料血液血液型一次検査において，自動輸血検査装置PK7300（以下PK）は献血者のABO・RhD血液型を検査する役割を担っており，試薬や検体の分注，反応，判定までが自動で行われる。PKは反応後のマイクロプレート（以下プレート）上のウェルの下方からに光を照射して，通過した光を上方からCCDカメラで画像データに変換して測光値（P，SPC，C，LIA，P/C）を算出し，あらかじめ設定したしきい値によって，凝集反応像を判定するシステムである[1]（**図1**）。

PKを用いた検査工程においてウェル内に異物（ゴミ・泡）が混入すると，反応像および測光値に影響を及ぼし，試薬との反応における赤血球凝集判定（以下試薬判定）で誤判定を起こす可能性がある。そのため，PKの自動判定終了後は担当者2名によるウェルの目視確認を行っている。一方で，PKには画像データ分析で異物を検出する機能や，任意設定された範囲（ダイナミックレンジ）から外れる測光値を示すと判定保留にする機能が備わっている[2]。

異物は直径およそ1.3mmの陰性像の血球と同程度または陰性像よりも小さく，また血球と似た暗い色をしていることも多い。そのため，実際，異物混入があった場合は目視では認識困難で，PKの自動判定により判定保留となることが多い。目視確認は正確性や客観性に欠け，加えて作業時間がかかるというデメリットもあるため，今回その意義について検証した。

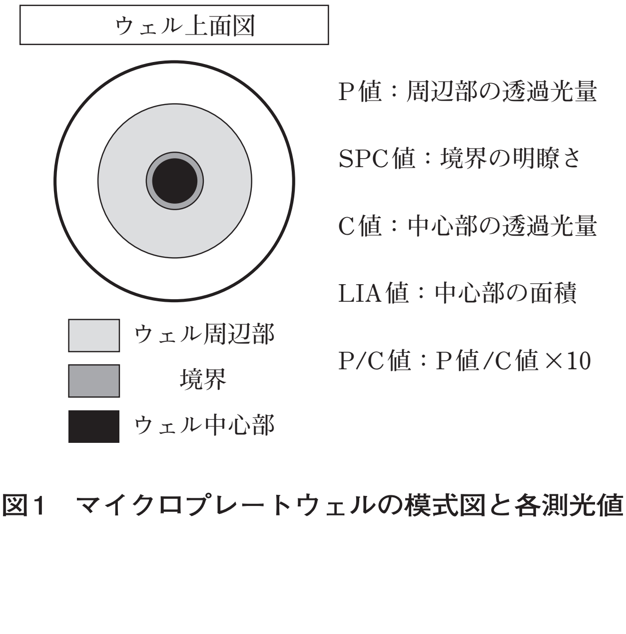

図1　マイクロプレートウェルの模式図と各測光値

【対象および方法】

血液型一次検査用検体328,509検体（2018年1月～2019年4月）について，8つのルーチン検査用試薬（抗D，陰性対照，抗A，希釈抗A，抗B，希釈抗B，A血球，B血球）に対する反応のウェル画像を確認した。328,509検体×8試薬=2,628,072例について，異物混入や分注不良例の頻度と自動判定結果を調査した。

さらに，異物が混入したときの判定への影響を調査するため，分析前のウェル220例に実験的に異物（黒い紙片，短径約1mm～2mm×直径2mm×3mmで円状または不規則な形状）を混入させたのち，通常の測定を行い，自動判定結果を調査した。

これらのなかで自動判定では検知されなかった異物混入事例と正常像の測光値を比較し，異物発見において有効となる測光値を調査した。

【結　果】

期間中，血液型一次検査における異物混入事例は361例みられ，全体の0.014％であった。内訳は，乳び174例，分注不良による血球量過多または過少92例，泡混入56例，ゴミ混入18例，血球カス16例，フィブリン塊混入４例，溶血１例であった。また，361例のうち，283例（78％）はいずれかの測光値が異常値を示し，76例（21％）は画像データ分析で異物が検出され，合計で359例（99％）が自動判定で判定保留となっていた（**図２a**）。残りの２例（１％）はPKが異物混入を検知できていなかった。この２例のうち，１例は抗Aで，１例は希釈抗A試薬で偽陰性を呈した。ただし２例とも，他の試薬判定結果は正常であったため，同一検体内で抗A試薬判定結果と希釈抗A試薬判定結果に乖離が生じてPKでの血液型判定は保留となった。

実験的に異物を混入させたサンプルでは，全220例中，56例（25％）で測光値が異常値を示し，118例（54％）は画像データ分析で異物が検出され，合計で174例（79％）が自動判定で保留となっていた（**図２b**）。また，異物混入が検知されなかったが判定に影響しなかったものが38例（17％）みられた。残りの８例（４％）は異物混入が検知されず，いずれも偽陰性を呈した。なお，すべての異物混入例事例で偽陽性は発生しなかった。

前述の偽陰性計10例の各測光値，および真の陰性がとる測光値範囲を**表１**に示した。真の陰性の範囲は，期間中に陰性対照試薬と正常反応（陰性）を示した全328,485検体の測光値平均±５SDとした。SPC値は(a)を除く９例，LIA値は(b)と(g)を除く８例，C値は１例(b)，P/C値は３例(a)(b)(i)が，真の陰性の範囲に含まれた。一方，P値については，10例すべてが真の陰性の範囲よりも低い値であった。

【考　察】

ウェル内に異物が混入すると，血液型一次検査では361例中２例で，実験的な異物混入では220例中８例で，偽陰性を示すことが明らかとなった。この偽陰性が血液型検査に及ぼす影響について，RhD血液型検査とABO血液型検査に分けて考察した。

RhD血液型検査では，**表２a**で示す通り自動判定をおこなっている。各反応パターンにおいて，偽陰性が生じた場合の判定を検証した（**表２b**）。No.1，No.2，No.3は抗D試薬判定が陰性（または偽陰性）のため再検査となるので影響はない。しかし，No.4において陰性対照試薬判定が偽陰性となった場合は，D陽性と誤判定される。このように，現状のPKの設定では偽陰性が原因で誤判

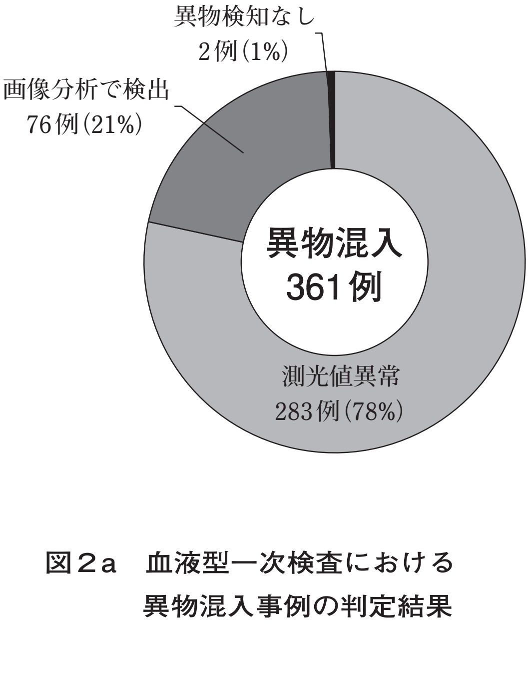

図２a　血液型一次検査における異物混入事例の判定結果

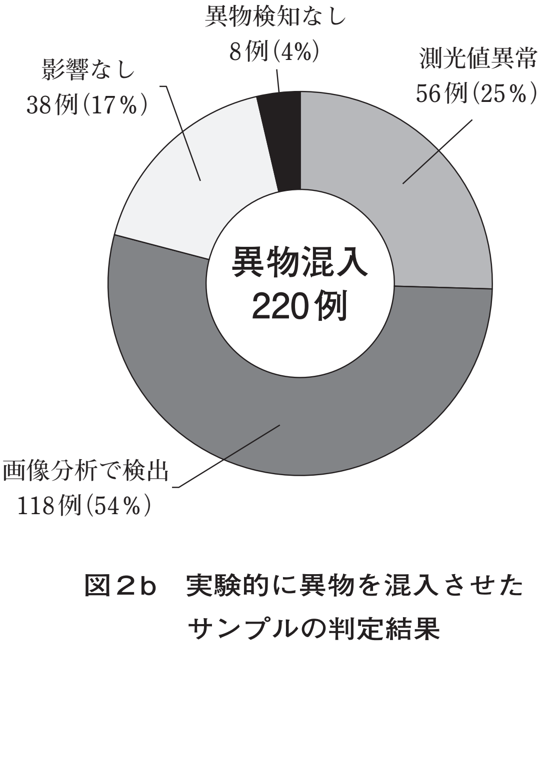

図２b　実験的に異物を混入させたサンプルの判定結果

表1　偽陰性と真の陰性の測光値

		SPC	LIA	C	P/C	P
一次検査中の偽陰性	(a)	38	604	11	51	56
	(b)	23	199	15	39	58
実験的な異物混入における偽陰性	(c)	37	697	7	71	50
	(d)	36	442	7	80	56
	(e)	35	647	7	90	63
	(f)	33	602	8	64	51
	(g)	31	759	7	77	54
	(h)	29	587	7	87	61
	(i)	28	323	11	50	50
	(j)	24	601	8	76	61
真の陰性(※)		27±9	451±247	17±3	43±9	73±6

■ 真の陰性の範囲外である値
□ 真の陰性の範囲内である値
※陰性対照試薬に対する正常反応
平均±5SD(n=328,485)

表2a　RhD血液型検査の判定

反応パターン	試薬判定結果		PK判定	RhD血液型
	抗D	陰性対照		
No.1	＋	－	＋	陽性で確定
No.2	－	－	－	再検査
No.3	－	＋	保留	再検査
No.4	＋	＋	保留	再検査

表2b　各パターンにおいて偽陰性が生じた場合の判定

反応パターン	試薬判定結果		PK判定	RhD血液型
	抗D	陰性対照		
No.1	*－	－	－	再検査
No.3	－	*－	－	再検査
No.4	*－	＋	保留	再検査
	＋	***－**	**＋**	**陽性で確定**

*－は偽陰性
No.2は、各試薬判定結果がもともと陰性であるため影響なし

定をおこす可能性がある。

偽陰性を区別するため，今回検出された偽陰性10例のＰ値に着目すると，いずれも真の陰性のＰ値の範囲よりも低値であった（**表１**）。Ｐ値とはウェル周辺部の透過光量であり（**図１**），赤血球が中心部に集まる真の陰性では高値に，背景に膜状の凝集がある偽陰性では低値になると考えられた。真の陰性のＰ値は67 ～ 79に分布していた。一方，偽陰性例(a) ～ (j)のＰ値は50 ～ 63に分布しているため，Ｐ値のダイナミックレンジ(Low)を新たに66に設定し66未満を再検査対象とすると，偽陰性のみ再検査対象にすることが可能と考えられた（**図３**）。これにより，RhD血液型検査については目視確認の廃止が可能と考えられた。

ABO血液型検査では，正常検体で単一の試薬に偽陰性が生じても，他の試薬判定結果が正常であれば，試薬判定結果の乖離によりすべて再検査対象となると考えられる。よってここでは正常とは反応態度が異なる亜型について考察する。Ａ亜型を例にすると，通常は**表３**に示す通りＡ抗原の減弱や不規則抗Ａ抗体の保有により再検査対象となる[3)]。これらについて，偽陰性が生じた場合の判定結果を検証すると，多くは再検査対象となると予想された（**表４**）。Ａ亜型No.3は，Ａ血球試薬判定で偽陰性となると正常Ａ型と誤判定されるが，仮にこの亜型由来の血漿製剤がＡ型の患者に輸血されたとしても，製剤中の不規則抗Ａ抗体はただちに希釈されるため[4)]，有害事象を起こす可能性はないと考えられる。しかしＡ亜型No.4において，抗Ａ試薬判定で偽陰性となりＯ型と誤判定され，この赤血球製剤がＯ型として出庫された場合，Ｏ型の患者血漿との交差適合試験で陽性となる可能性がある。Ｂ亜型やAB亜型についても同様の可能性が考えられる。期間中の328,509検体を調査すると，このような誤判定がおこる可能性がある亜型が12検体認められた。12検体の内訳は，Ａ亜型No.3の反応態度を示すものが４件のほか，AB亜型でＡ抗原が弱く不規則抗Ａを保有しているものが４件，同じくAB亜型でＢ抗原

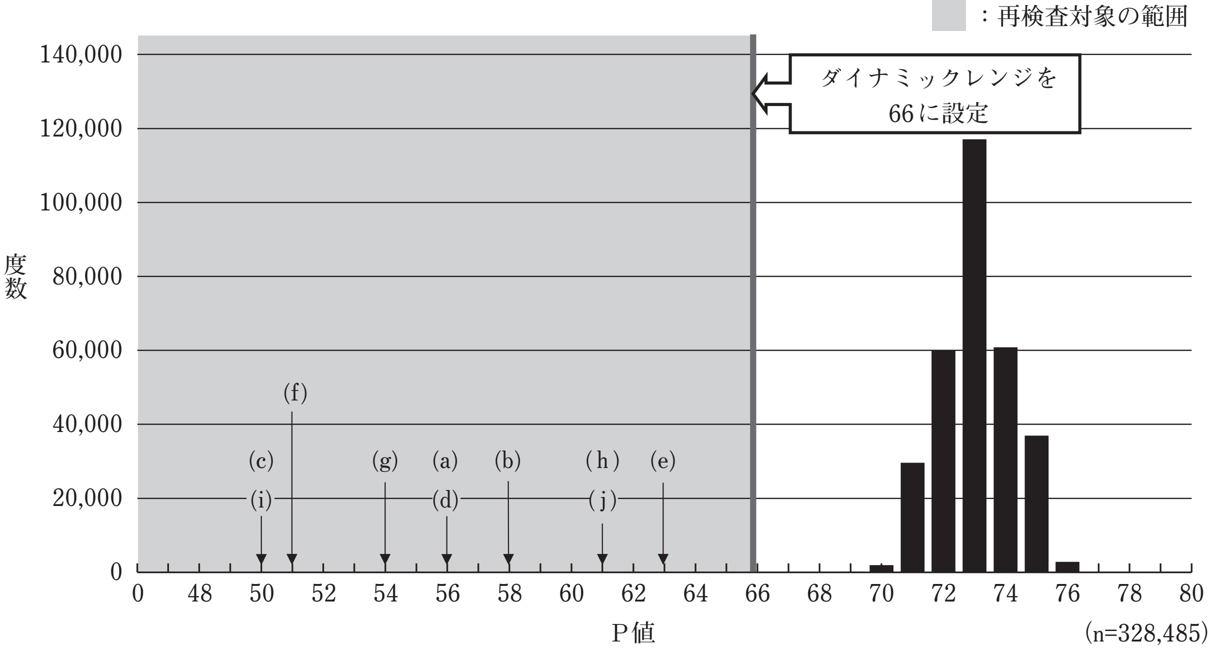

図３　陰性対照試薬を用いた場合のＰ値ヒストグラム

陰性対照試薬のＰ値ヒストグラムと偽陰性例(a) ～ (j)のＰ値について，分布は重複しておらず，ダイナミックレンジ設定によって偽陰性例のみ再検査対象として区別できると考えられた。

表３　Ａ亜型の判定例

	抗体試薬判定結果				PKオモテ判定	血球試薬判定結果		PKウラ判定	ABO血液型
	抗A	希釈抗A	抗B	希釈抗B		A血球	B血球		
正常A型	＋	＋	－	－	A	－	＋	A	A型で確定
A亜型No.1	＋	－	－	－	保留	－	＋	A	再検査
A亜型No.2	－	－	－	－	O	－	＋	A	再検査
A亜型No.3	＋	＋	－	－	A	＋	＋	O	再検査
A亜型No.4	＋	－	－	－	保留	＋	＋	O	再検査

表４　Ａ亜型において各試薬が偽陰性となった場合の判定

	抗体試薬判定結果				PKオモテ判定	血球試薬判定結果		PKウラ判定	ABO血液型
	抗A	希釈抗A	抗B	希釈抗B		A血球	B血球		
正常A型	*－	＋	－	－	保留	－	＋	A	再検査
	＋	*－	－	－	保留	－	＋	A	再検査
	＋	＋	－	－	A	－	*－	AB	再検査
A亜型No.1	*－	－	－	－	O	－	＋	A	再検査
	＋	－	－	－	保留	－	*－	AB	再検査
A亜型No.2	－	－	－	－	O	－	*－	AB	再検査
A亜型No.3	*－	＋	－	－	保留	＋	＋	O	再検査
	＋	*－	－	－	保留	＋	＋	O	再検査
	＋	**＋**	**－**	**－**	**A**	***－**	**＋**	**A**	**A型で確定**
	＋	＋	－	－	A	＋	*－	B	再検査
A亜型No.4	***－**	**－**	**－**	**－**	**O**	**＋**	**＋**	**O**	**O型で確定**
	＋	－	－	－	保留	*－	＋	A	再検査
	＋	－	－	－	保留	＋	*－	B	再検査

*－は偽陰性

が弱く不規則抗Ｂを保有していたものが４件であった。

RhDと同様に，抗Ａ試薬の　Ｐ値を調査すると，58～71に分布しており，陰性対照試薬と比べ値の範囲が広く，かつ低値となっていた（**図４**）。陰性対照試薬判定結果は多くの検体で陰性だが，抗Ａ試薬判定結果は検体の血液型によって陽性も陰性も混在するためと考えられた。偽陰性例と真の陽性では，どちらも膜状の凝集があるためＰ値の分布が重なり，判別が困難になる。仮に，偽陰性を捉えられるようにダイナミックレンジ（Low）を64に設定した場合，**図４**に示すように抗Ａ試薬判定が陰性の検体は0.7％，陽性の検体は70.7％の正常検体が再検査対象となる。このため抗Ａ試薬では誤判定を防ぐ有効なダイナミックレンジの設定は困難であると考えられた。また，抗Ｂ試薬についても同様であった。

これらの結果に基づき，異物混入による誤判定頻度を試算すると，該当する亜型の頻度12検体/328,509検体×偽陰性頻度２例/2,628,072例≒360億分の１となる。全国の献血者数は年間5,378,634人（平成30年度）であり[5]，亜型や偽陰性の頻度が全国で同じと仮定すると，誤判定がおこるのは約7000年に１度と，非常にまれであると推察される。

今回の検証では目視判定を省略しても誤判定を完全に防止できることは証明できなかった。しかし，自動判定の精度は極めて高いため，現在２名で行っている目視確認をPKの自動判定と１人の目視確認に簡略化することは可能と考える。今後，人工知能技術などを活用し，大量の画像データを学習させることが可能になれば，偽陰性判別の精度は向上すると考えられる。

【結　　語】

RhD血液型検査ではＰ値ダイナミックレンジの設定で陰性対照試薬の偽陰性を判別できるため，目視確認の廃止が可能と考えられた。ABO血液型検査では，誤判定が起こる可能性が極めてまれであった。プレートの確認についてPKの機器判定と１名の目視確認に簡略化できる可能性が高いと考えられた。

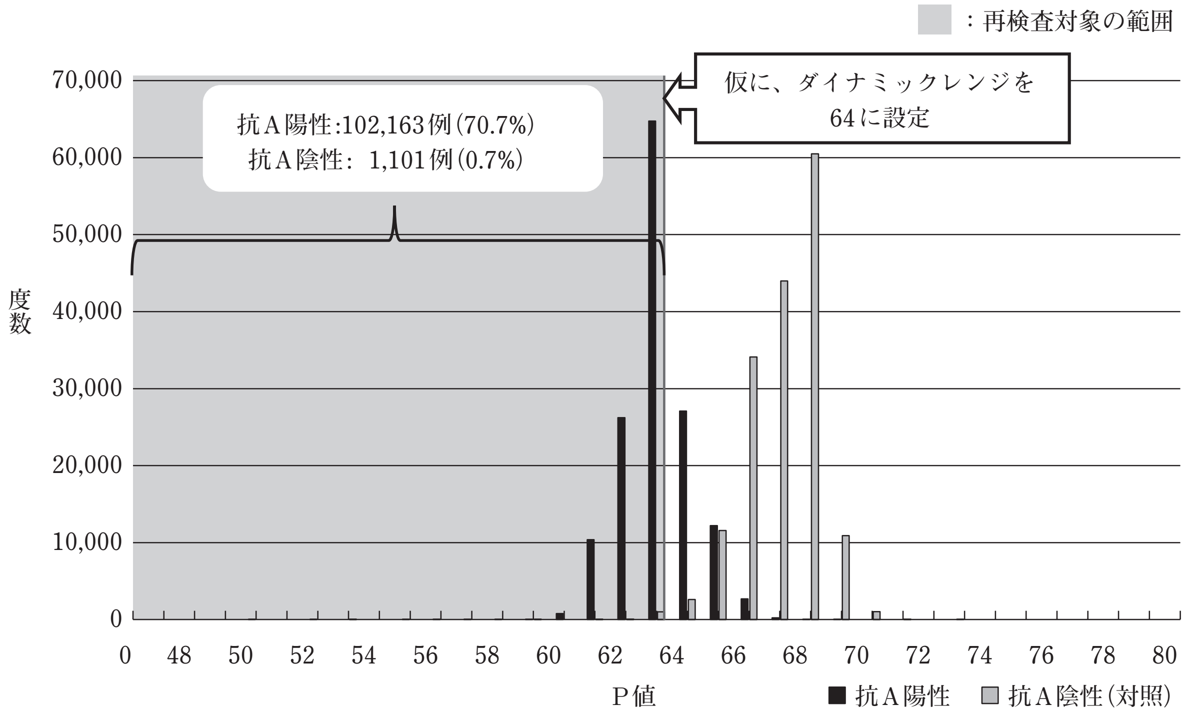

図４　抗Ａ抗体試薬を用いた場合のＰ値ヒストグラム

再検査対象範囲に，期間中の抗Ａ試薬判定が陽性である検体の約70.7％が含まれた。この70.7％は，実際には再検査の必要がないにもかかわらず，ダイナミックレンジ設定が原因で再検査対象となると推測された。

引用文献

1) 関口定美，加藤俊明：PK7200による輸血検査の自動化の現状輸血・血液製剤療法ガイド，Medical Practice vol.9 臨時増刊号別冊，1992

2) 三瓶雅迪，他：自動血液型検査の妥当性に関する統計学的評価，血液事業41:723-733. 2018.

3) 輸血検査標準化部会：新輸血検査の実際，日本臨床衛生検査技師会，改訂第３版，2002.

4) 上村　知恵：交差適合試験の副試験を省略しても安全な輸血は可能か？，第７回東京都輸血療法研究会（2008年11月21日実施）
https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/iryo/k_isyoku/yuketsu_kenkyukai.files/７houkoku2.PDF（2020年７月現在）

5) 日本赤十字社　血液事業本部.：血液事業年度報平成30年度統計表，日本赤十字社ホームページ
http://www.jrc.or.jp/activity/blood/data/（2020年８月31日現在）