

報 告

ポリエチレングリコール間接抗グロブリン試験 (PEG-IAT) における
高グロブリン血症による血球凝集 false negative 現象

渡部 和也¹⁾ 竹内千華子¹⁾ 横田 睦子¹⁾ 山口 富子¹⁾
安田 広康¹⁾ 大戸 斉¹⁾ 吉田 詠子²⁾ 青木 義政³⁾

¹⁾福島県立医科大学医学部附属病院輸血・移植免疫部

²⁾同 検査部

³⁾長野市民病院臨床検査科

(平成13年10月1日受付)

(平成14年4月25日受理)

FALSE NEGATIVE AGGLUTINATION PHENOMENON IN HYPERGLOBULINEMIA SERUM
IN THE POLYETHYLENEGLYCOL INDIRECT ANTI-GLOBULIN TEST

Kazuya Watanabe¹⁾, Chikako Takeuchi¹⁾, Mutsuko Yokota¹⁾, Tomiko Yamaguchi¹⁾,
Hiroyasu Yasuda¹⁾, Hitoshi Ohto¹⁾, Eiko Yoshida²⁾ and Yoshimasa J. Aoki³⁾

¹⁾Division of Blood Transfusion and Transplantation Immunology, Fukushima Medical University Hospital

²⁾Clinical Laboratory, Fukushima Medical University Hospital

³⁾Clinical Laboratory, Nagano Municipal Hospital

IgG-coated RBCs are routinely used to confirm appropriate procedures when negative hemagglutination occurs in the indirect antiglobulin test (IAT). We undertook this study after encountering a case of agglutination failure of IgG-coated RBCs by polyethyleneglycol (PEG)-IAT in a patient with hyperglobulinemia.

We investigated whether IgG-coated RBCs could be agglutinated by anti-IgG using the PEG-IAT technique after incubation with 143 sera, in which no irregular anti-red cell antibodies were present, from patients with hyperglobulinemia.

Failure of agglutination (false negative reaction) was found more frequently ($p < 0.001$) with the original PEG-IAT (4 drops in test mixture) (46/143 sera; 32%) than the modified PEG-IAT (2 drops) (15/143 sera; 11%). The rate of residual-IgG in the supernatant in the mixture of PEG and patient's serum was significantly ($p < 0.01$) higher with the modified than the original method, at 14.4% vs. 3.0% in hyperglobulinemia patients and 28.5% vs. 5.7% in healthy controls.

The addition of anti-D alloantibody (final titer 1:4) in 3,000~5,000mg/dL of immunoglobulin concentration revealed that PEG could cause false-negative IAT results due to the neutralization of anti-IgG through precipitation of immunoglobulins in testing tubes.

Albumin-IAT, low ionic strength solution-IAT or saline-IAT may assist in resolving interference by PEG in cases of hyperglobulinemia.

Key words : hyperglobulinemia, polyethyleneglycol, indirect antiglobulin test, false negative phenomenon

はじめに

赤血球輸血による溶血性副作用，特に遅発性溶血を防止するためには，高感度の検査法が必須である．そのひとつに，メディウムを用いた間接抗グロブリン試験（IAT法）の中でもより感度が良いとされるポリエチレングリコール間接抗グロブリン試験（PEG-IAT）がある^{1)~5)}．IAT法では凝集が陰性の場合，IgG感作O型血球を滴下し，それが凝集することにより陰性の試験結果を確認することが標準となっている．

1999年，高免疫グロブリン血症患者の血清がPEG-IAT法によって，IgG感作O型血球確認凝集陰性となった現象を経験した．これを機に，高免疫グロブリン血症がPEG-IAT法に与える影響について検討した．

対 象

M蛋白血症23例含む，高免疫グロブリン血症血清143検体を対象とした．正常対照には健常人血清4検体を用いた．なお，これら患者血清と健常人血清中には不規則抗体は存在しなかったことをアルブミン間接抗グロブリン試験（Alb-IAT）にて確認した．

方 法

1．Polyethyleneglycol（PEG）溶液滴下量によるPEG-IAT法の比較

PEG-IAT法は患者血清，パネル血球（サージスクリーン，Ortho Clinical Diagnostics社）およびPEG溶液を混和し，37℃15分間インキュベートした後，生理食塩液で4回血球を洗浄し（日立MC400），ウサギ由来抗ヒトIgG血清（Ortho Clinical Diagnostics社）を2滴滴下後，遠心判定する．この時，陰性判定の時のみIgG感作O型血球を滴下し，凝集することで試験結果を確認することとしている（Fig.1）．

PEG滴下量によるPEG-IAT法の比較をおこなう目的で，PEG滴下量を4滴で行う原法^{1)~5)}と2滴で行う福島医大の変法（半量法）を並行して行い，IgG性抗E抗体感作O型血球の凝集が陰性化した検体数を算出した．なお，先の報告により⁷⁾PEG添加量4滴（原法）と2滴（半量法）によるIAT法の不規則抗体検出率に有意な差は見られ

ず，我々はルーチンとして半量法を用いてきた．対照検査法として，重合ウシアルブミン（Ortho Clinical Diagnostics社）を用いた，アルブミン間接抗グロブリン試験（Alb-IAT）を行った．

2．PEG濃度差による上清IgG残存率

血清IgGの沈殿がPEG添加によって差がみられるかどうか，10例の高免疫グロブリン血症患者と健常人血清4例を用い，PEG添加前の血清IgG量とPEG添加後37℃15分インキュベーション後，遠心した検体の上清IgG残存量を測定した．IgG濃度はBehring Nephelometer Analyzerull（デイドベリング社）にて測定した．

また，血清とPEGを1:2（原法），1:1（半量法）の割合で混和し，37℃15分インキュベーション後，遠心（3,000rpm，34秒）した検体の上清IgG残存率を調べた．なお，IgG残存率は37℃15分インキュベーション後の上清IgG濃度の値を，インキュベーション前血清のIgG濃度に対する割合で示した．

3．PEG-IAT法による抗体検出に及ぼす高免疫グロブリン血清の影響

高濃度のIgG蛋白が不規則抗体の検出法に与える影響を明らかにするために，免疫グロブリン製剤（献血ヴェノグロブリン-IH；Welfide社）をPBSで希釈し，IgG濃度勾配系列（3,000~5,000mg/dL）を各1,000μL作成した．そこへ力価4,000倍のヒト由来抗D抗体を1μLずつ添加して，最終力価約4倍の不規則抗体（抗D抗体）を含む擬似高免疫グロブリン血清を作成した．また，PBS1,000μLに抗D抗体を1μL添加した抗D抗体陽性対照，およびIgG5,000mg/dL免疫グロブリン製剤のみの抗D抗体陰性対照を作製した．

上記の擬似高免疫グロブリン血清各100μLを用いて，O型CcDEe血球を標的細胞としたPEG-IAT（原法および半量法），Alb-IATを施行し，抗D抗体検出の可否およびIgG感作O型血球凝集の強弱を観察した．

4．ポリエチレングリコール溶液

Polyethylene Glycol（Sigma社；MW3350）をPBS（pH7.3）にて，20%（w/v）に溶解し，防腐剤として0.05%（w/v）Sodium Azide（和光純薬）

2 drops of patient's serum + 1 drop of 3% 5% RBC + 4 drops (original) or 2 drops (modified) of 20% PEG solution
Incubate at 37°C for 15 minutes
Wash RBCs 4 times with saline
Add 2 drops of antihuman globulin
Centrifuge at 3,400 rpm for 15 seconds and observe agglutination (when negative)
Add 1 drop of IgG coated RBCs
Centrifuge at 3,400 rpm for 15 seconds and confirm the procedure by positive agglutination

Fig. 1 Procedures of original and modified PEG-IAT methods

Table 1 Rate of false negative agglutination of IgG-coated RBCs

	False negative	
	Hypergammaglobulinemia serum	M-protein serum
PEG-IAT: Original method *1	46/143 (32.2%)	9/23 (39.1%)
PEG-IAT: Modified method *2	15/143 (10.5%)	4/23 (17.1%)
Albumin-IAT	0/143 (0%)	0/23 (0%)

*1: Addition of 4 drops of PEG to test mixture

*2: Addition of 2 drops of PEG to test mixture

を添加した⁷⁾。

5. IgG 感作 O 型血球の作製

1993年に当部にて採取し、-80℃に凍結保存しておいた母児不適合産婦血清 (Alb-IAT 抗体価 1,024 倍の抗 E 抗体) と O 型 CcDEe 血球に 37℃で 60 分間感作後、Alsever's Solution (Gamma 社) を用いて 3% 血球浮遊液とした⁸⁾。

6. 抗 D 抗体 (母児不適合産婦血清)

1987年に当部にて採取し、-80℃に凍結保存しておいた血清を用いた。抗体価は、O 型 CcDEe 血球を標的細胞として、Alb-IAT にて 4,000 倍、PEG-IAT (半量法) にて 6,400 倍であった。

なお、抗 D 抗体陽性対照検体は、PBS を用いて最終力価 4 倍となるよう調整した。

統 計

PEG 原法と PEG 半量法の陰性化率比較検討には、母比率の差の検定を用いた。PEG 添加後 37℃15 分インキュベーション後に遠心した検体の

上清 IgG 残存率の比較は t 検定を用いた。なお、 $p < 0.05$ の場合に統計的有意差があったとした。

結 果

1. PEG 滴下量による PEG-IAT の比較

PEG 原法では 46/143 例 (32.2%)、PEG 半量法では 15/143 例 (10.5%) に IgG 感作 O 型血球凝集の偽陰性化が認められた ($p < 0.001$)。

M 蛋白を含んでいる 23 血清のうち、PEG 原法では 9 検体 (39.1%)、PEG 半量法で 4 検体 (17.4%) に IgG 感作 O 型血球凝集の偽陰性化を認めたが、有意差は無かった。

なお、対照検査法である Alb-IAT では、高免疫グロブリン血症血清 143 検体全てに、IgG 感作 O 型血球に凝集を確認した (Table 1)。

2. PEG 濃度差による上清 IgG 残存率

血清に PEG を加えて混和し、PEG-IAT と同等条件のインキュベーション、遠心を行うことにより、血清は沈殿反応を生じた。

Table 2 Percentage of residual IgG remaining in the mixture of PEG and sera of patients with hypergammaglobulinemia

Concentration of IgG in serum (mg/dL)	Concentration of IgG in supernatant serum				
	Modified method *1		Original method *2		
	mg/dL	%	mg/dL	%	
Patient 1	7,740	205	2.6	31	0.4
Patient 2	3,440	470	13.7	53	1.5
Patient 3	2,450	482	19.7	91	3.7
Patient 4	3,330	487	14.6	97	2.9
Patient 5 *3	532	64	12.0	24	4.5
Patient 6	3,320	465	14.0	96	2.9
Patient 7	3,680	365	9.9	78	2.1
Patient 8	3,520	509	14.5	105	3.0
Patient 9	2,260	396	17.5	81	3.6
Patient 10 *4	849	214	25.2	48	5.7
Patients mean		365.7	14.4	70.4	3.0
Control 1	1,620	390	24.1	84	5.2
Control 2	1,340	380	28.4	66	4.9
Control 3	1,520	436	28.7	91	6.0
Control 4	1,700	558	32.8	111	6.5
Healthy control mean		441	28.5	88	5.7

*1 Modified method: Addition of 2 drops of PEG to test mixture

*2 Original method: Addition of 4 drops of PEG to test mixture

*3 IgA gammopathy (IgA, 3,770mg/dL)

*4 IgM gammopathy (IgM, 1,870mg/dL)

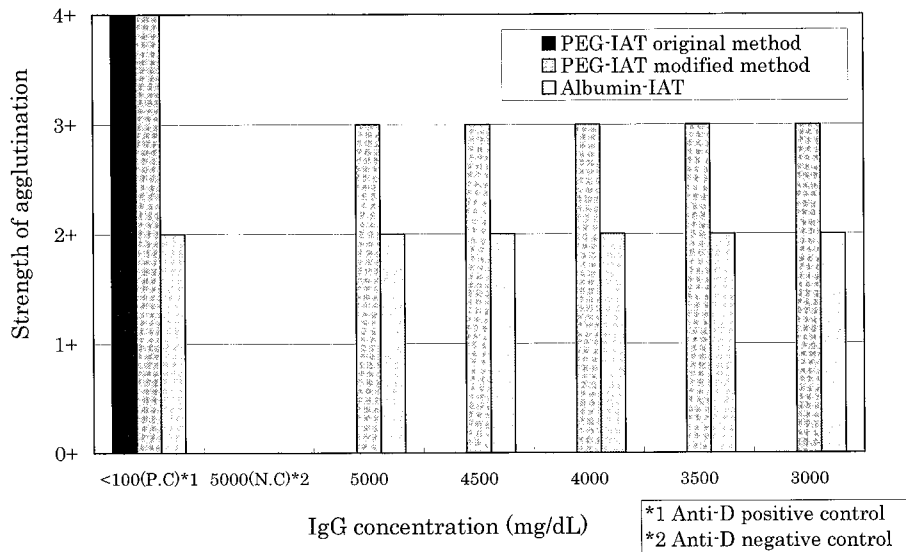


Fig. 2 False negative agglutination by anti-D on original PEG-IAT in high concentrations of intravenous immunoglobulin

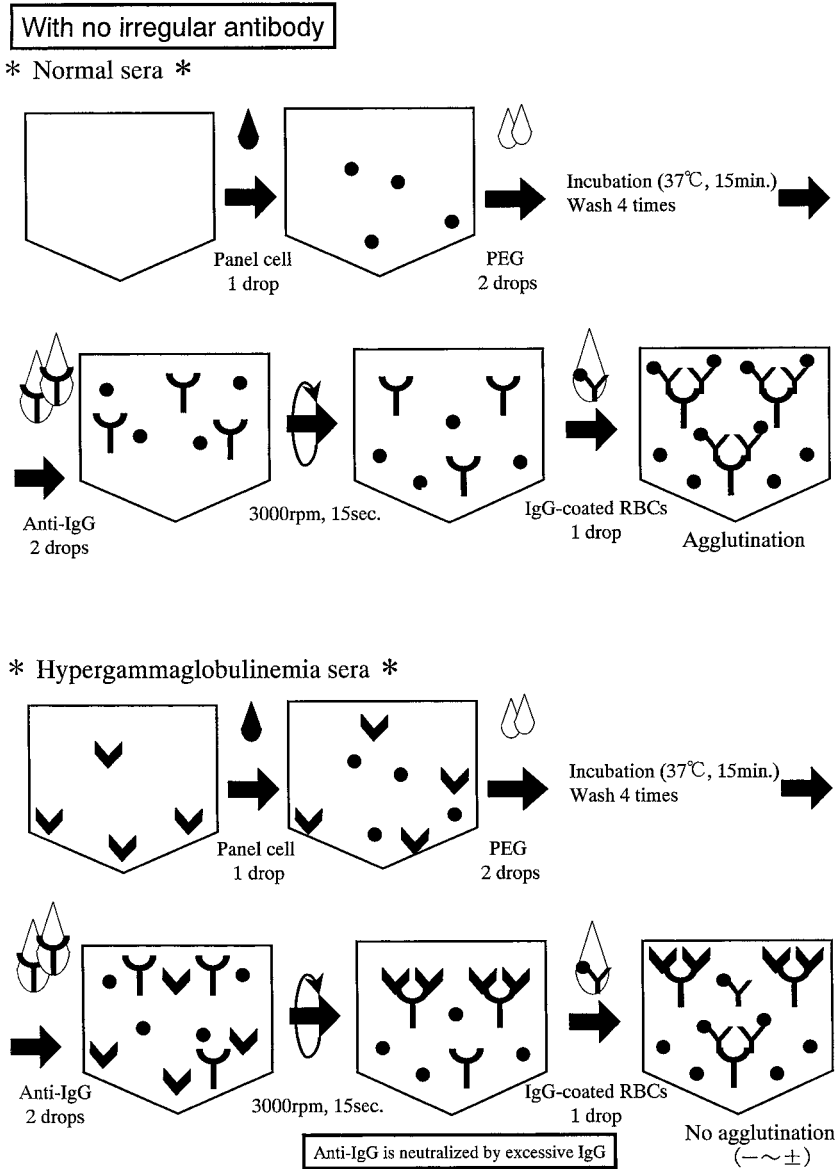


Fig. 3 1 Mechanism of false negative agglutination of positive control cells in hypergammaglobulinemia sera with no irregular antibody

上清中に残存する IgG は、健常人では PEG 半量法では平均 28.5%、PEG 原法では 5.7% であった ($p < 0.01$)。高免疫グロブリン血症患者では PEG 半量法では平均 14.4%、PEG 原法では平均 3.0% で有意に原法のほうが、上清残存 IgG は少なかった ($p < 0.01$) (Table 2)。

3. PEG-IAT による抗体検出に及ぼす擬似高免

疫グロブリン血清の影響

力価 4 倍に調整した抗 D 抗体を含む擬似高免疫グロブリン血清は、A1b-IAT では一律に 2+ の強さで D 陽性血球を凝集し、5,000mg/dL の IgG 高濃度でも抗 D 抗体を検出できた。

PEG 半量法では D 陽性血球の凝集が観察された。免疫グロブリン製剤を含まない抗 D 抗体(カ

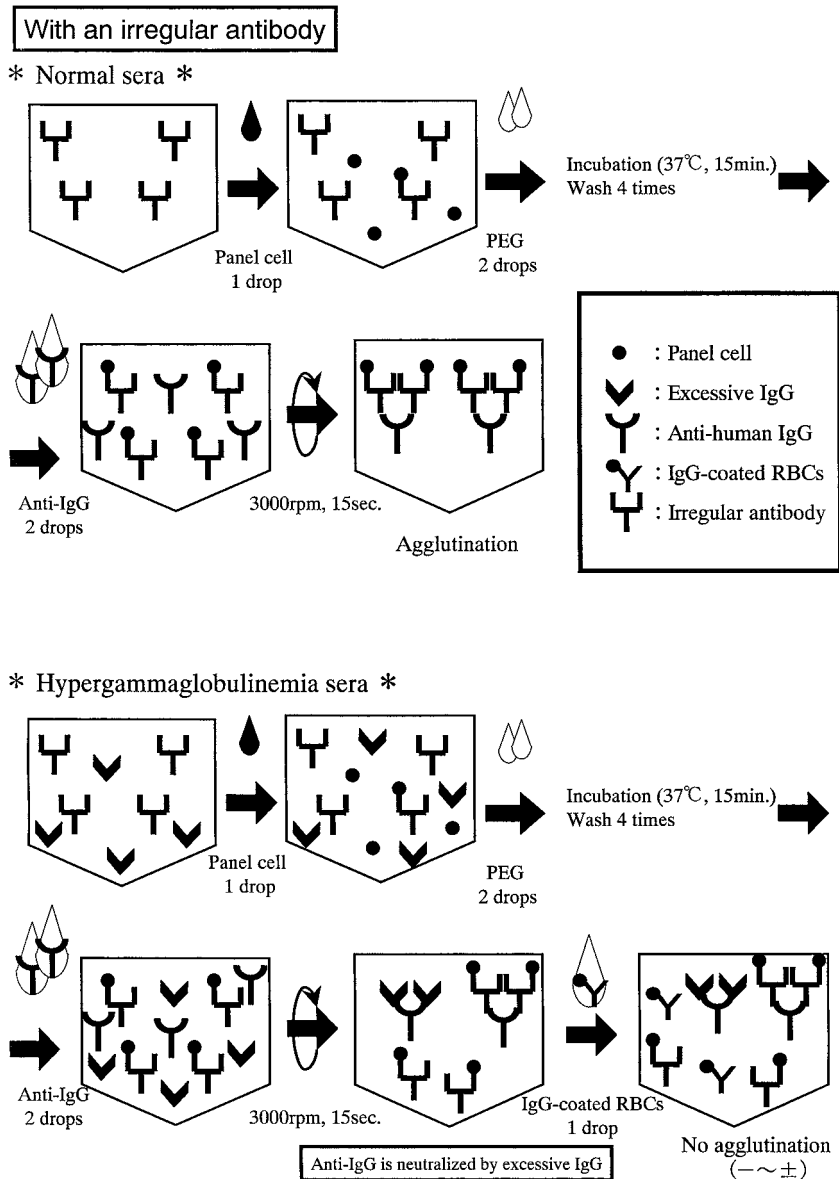


Fig. 3 2 Mechanism of false negative agglutination of positive control cells in hypergammaglobulinemia sera with an irregular antibody

価 4 倍に調整)陽性対照では 4+ であったが, IgG 濃度 3,000mg/dL 以上ではやや減弱 3+ 傾向を認めた .PEG 原法では抗 D 抗体陽性対照以外に凝集がみられず, 擬似血清中の抗 D 抗体を検出できなかった .さらに IgG 感作 O 型血球を滴下後遠心してもその凝集は認めず, 判定保留となった (Fig. 2).

考 察

PEG は, エチレングリコールを直鎖状に結合した高分子ポリマーで, 溶液中での免疫複合物質の形成促進剤として用いられる . 赤血球周囲のゼータ電位を減じ, PEG 分子の周囲に赤血球を引き寄せ, 抗体の結合を増強させる効果があるといわれる . また, 赤血球膜表面上に存在する水分子を除

去することにより、隣接する二つの赤血球の表面が一斉に集結し、反応体の衝突回数を増し、赤血球が密接に重なり、抗体の架橋を容易にする。この脱水作用は「立体的排他現象」といわれ、PEGはこの機序によって凝集反応を増強させている³⁾⁹⁾。

PEG やアルブミンなどの反応増強剤を用いて間接抗グロブリン試験を行う場合、洗浄によって余分な免疫グロブリンを除去する事が特に重要である¹⁰⁾。しかし、PEG は免疫グロブリンに重合および変性をおこさせ、その添加量を増やすと、さらに沈殿を起こしやすくさせる (Table 2)。

一般的に、不規則抗体スクリーニングでは、自動血球洗浄遠心機を用いる。この際、適正な洗浄が行われたか、IgG 感作 O 型血球を用いて確認する¹¹⁾。しかし、高免疫グロブリン血症では、PEG の添加によって免疫グロブリンは変性し、ゲル化した免疫グロブリンは遠心するとペースト状に試験管底に沈殿し、自動血球洗浄機では十分な洗浄が不可能になる¹²⁾。特に、高 IgG 血清は変性を起こしやすく、沈殿した IgG がグームス血清中の抗 IgG 抗体を中和してしまうため、IgG 感作 O 型血球は凝集できなくなってしまう (Figs. 3 1 3 2)。

高免疫グロブリン血症における低力価不規則抗体を検出する上で、擬似検体を用いて Alb-IAT は高免疫グロブリンの影響を受けずに検出することができた。また、我々が用いている PEG 試薬は市販品ではなく、自家調整したものである⁶⁾。原法では PEG を 4 滴で使用するが、PEG の添加量が多いと、免疫グロブリンが沈殿しやすくなってしまふことが明らかとなった (Table 2)。その影響を受けにくくするために、PEG 添加量を 2 滴に減じることにより免疫グロブリンの沈殿を抑えられることがわかった (Fig. 2)。なお、PEG 半量法でも不規則抗体の検出感度に影響を与えないことを確かめている⁷⁾。

まとめ

1. 血清に PEG を加えて遠心を行うと、PEG の添加量が多いほど血清 IgG の沈殿反応を促進した。

2. IgG 濃度 3,000 ~ 5,000mg/dL の擬似高免疫

グロブリン血清に抗 D 抗体を添加すると、原法 (PEGU4 滴) では抗 D 抗体 (最終力価 4 倍) を検出することができなかった。また、IgG 感作 O 型血球でも凝集を認めなかった。このことから、不規則抗体を有する高免疫グロブリン血症に PEG-IAT を用いると、抗体スクリーニングや交差適合試験で、偽陰性化が生じる可能性がある。

3. PEG-IAT で IgG 感作 O 型血球が陰性である場合、M 蛋白血症など免疫グロブリンの質的・量的異常を考慮し、Alb-IAT や、37 60 分感作 IAT 等で再検査するのが望ましい。

4. 福島医大変法 (PEG 半量法) は、先の報告⁷⁾において PEG 原法と半量法を用いた IAT では、不規則抗体の検出率に有意な差は見られず、また原法に比し高免疫グロブリン血清の影響を受けにくいというメリットがあり、日常の抗体スクリーニング検査として有用である。

文 献

- 1) Nance, S.J., Garratty, J.: A new potentiator of red blood cell antigen-antibody reactions. *Am. J. Clin Pathol.*, 87: 633-635, 1987.
- 2) Wenz, B., Apuzzo, D.P.: Evaluation of the polyethylene glycol-potentiated indirect antiglobulin test. *Transfusion*, 30: 318-321, 1990.
- 3) Shirey, R.S., Boyd, J.S., Ness, P.M.: Polyethylene glycol versus low-ionic-strength solution in pre-transfusion testing: a blinded comparison study. *Transfusion*, 34: 368-370, 1994.
- 4) 大久保進, 宮本厚子, 石田萌子, 安永幸二郎: 抗グロブリン試験 Polyethylene Glycol (PEG) 法の基礎的検討と抗赤血球自己抗体保有患者における臨床的意義. *日本輸血学会雑誌*, 40: 427-433, 1994.
- 5) 神田靖男, 星野茂角: ポリエチレングリコール (PEG) 液の検討 不規則抗体検出の反応促進剤として. *臨床検査機器・試薬*, 18: 872-874, 1995.
- 6) AABB: Polyethylene Glycol (PEG) Technique. *Technical Manual 10th edition*, pp558-559, 1990.
- 7) 山口富子, 安田広康, 佐藤久美子, 岩淵伸枝, 赤間敏子, 大戸 育: 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.
- 8) 日本臨床衛生検査技師会: IgG 感作血球の作り

- 方, 輸血検査の実際, pp174, 1986.
- 9) 日本臨床衛生検査技師会: PEG (ポリエチレングリコール) 法, 輸血検査の実際, pp66, 1986.
- 10) 小林信昌, 中塩屋千絵, 中村嘉彦, 兵藤 理, 長嶺由紀: ポリエチレングリコール (PEG) の間接抗グロブリン試験への応用と使用上の注意点について. 臨床検査機器・試薬, 18: 973-978, 1995.
- 11) 日本臨床衛生検査技師会: 間接抗グロブリン試験, 輸血検査の実際, pp68-69, 1986.
- 12) Polski, J.M., Creer, M.H., Ritter, D., Johnston, M.F. M.: Polyethylene glycol-induced immunoglobulin precipitation may cause invalidation of antiglobulin tests: *Transfusion*, 39: 537-539, 1999.
-