

原 著

各種検査法における赤血球 IgG 性同種抗体の検出感度の検討

佐々木正照¹⁾ 山田美加子¹⁾ 金子 礼子¹⁾
古谷 大輔¹⁾ 遠藤 輝夫¹⁾ 小林 大介²⁾
辻 直樹²⁾ 八木橋厚仁²⁾ 渡辺 直樹²⁾

¹⁾札幌医科大学医学部附属病院検査部

²⁾同 臨床検査医学講座

(平成 14 年 12 月 19 日受付)

(平成 15 年 7 月 3 日受理)

SENSITIVITY OF VARIOUS METHODS IN THE DETECTION OF
IgG ANTIBODIES TO RED CELL ANTIGENS

Masateru Sasaki¹⁾, Mikako Yamada¹⁾, Reiko Kaneko¹⁾, Daisuke Furuya¹⁾, Teruo Endoh¹⁾,
Daisuke Kobayashi²⁾, Naoki Tsuji²⁾, Atsuhito Yagihashi²⁾ and Naoki Watanabe²⁾

¹⁾Division of Laboratory Diagnosis and ²⁾Department of Clinical Laboratory Medicine,
Sapporo Medical University, School of Medicine

In recent years, new methods such as microtube column agglutination methods and microplate methods using automated instruments have been used for blood typing, antibody screening testing and crossmatching testing. However, no precise comparison study of the performance of these methods and conventional tube methods has been done.

In the present study, we performed a comparison study on sensitivity for IgG alloantibody by the tube indirect anti-globulin test (IAT) using polyethylene glycol (PEG), albumin, or low ionic strength saline solution (LISS), microtube column agglutination (Ortho BioVue and DiaMed MTS), and microplate solid phase system (Immucor Capture R Ready Screen, CRRS) methods.

Using 51 positive sera as determined by the tube IAT-PEG using anti-IgG antibody, the positive rates of tube IAT-albumin and tube IAT-LISS using anti-IgG antibody, BioVue (IgG cassette), MTS (IgG card) and CRRS (IgG bonded RBC) were 62.7%, 68.6%, 88.2%, 88.2% and 94.1%, respectively.

Using 12 commercial anti-sera and 25 patient sera, antibody reactivity as determined by AABB scores was compared between these 6 methods. Mean AABB scores were 51.4 with the tube IAT-PEG, 37.3 with the tube IAT-albumin, 37.4 with the tube IAT-LISS, 51.7 with BioVue, 53.8 with MTS, and 76.5 with CRRS.

These results indicate that the sensitivity of clinically significant red cell alloantibodies was similar or higher with the microtube column agglutination methods and CRRS than with the tube IAT methods.

Key words : Indirect antiglobulin test, IgG alloantibody, Enhancement media, Column agglutination system, Microplate solid phase system

I. はじめに

現在、不規則抗体検査や交差適合試験は、主に

試験管法で行われている。しかし、試験管法には
再現性や判定に熟練を要するなどの問題点があっ

Table 1 Comparison of the detection of IgG alloantibodies by various methods

No.	Specificity	Test cell antigen	Tube			Column		Microplate
			PEG-IAT	Al-IAT	LISS-IAT	Bio	MTS	CRRS
1	E	R2R2	19	8	9	17	16	17
2	E + c	R2R2	2	2	2	2	2	2
3	E + c	R1r	2	0	1	1	1	2
4	E + Jk ^b	R2R2 Jk (a + b -)	2	1	2	2	2	2
5	E + Jk ^b	R1R1 Jk (a - b +)	3	2	2	2	2	2
6	E + c + Jk ^b	R2R2 Jk (a + b -)	1	1	1	1	1	1
7	E + Jk ^a	R2R2 Jk (a - b +)	1	0	0	1	1	1
8	E + Jk ^a	R1R1 Jk (a + b -)	1	0	0	0	1	1
9	Jk ^a	Jk (a + b -)	1	0	0	1	1	1
10	D	R1R2	2	2	2	2	2	2
11	D	R2R2	3	3	3	3	3	3
12	D + C	R1R1	4	4	4	4	4	4
13	D + E	R2R2	2	2	2	2	2	2
14	Di ^a	Di (a + b +)	5	4	4	4	4	5
15	Fy ^b	Fy (a - b +)	2	2	2	2	2	2
16	Jr ^a	Jr (a +)	1	1	1	1	1	1
Positive number			51	32	35	45	45	48
Positive ratio (%)				62.7	68.6	88.2	88.2	94.1

PEG-IAT, Indirect antiglobulin test using polyethylene glycol; Al-IAT, Indirect antiglobulin test using polymerised albumin; LISS-IAT, Indirect antiglobulin test using low ionic strength solution; Bio, BioVue System; MTS, Micro Typing system; CRRS, Capture R Ready Screen.

た。近年、判定の客観性を高め、さらに、試料の微量化や操作の簡便化を目的として、各種検査法が開発されている。しかし、方法間における抗体検出感度の違いについては、いまだ不明な点が少なくない。そこで、試験管法3法、カラム法2法およびマイクロプレート法に関して、IgG性同種抗体の検出感度を比較検討した。

また、抗IgG血清を用いた抗グロブリン試験で、IgM抗体が検出されることがある。そこで、これら6法間におけるIgM抗体の陽性率についても併せて検討した。

II. 対象および方法

1. 対象

1) 札幌医科大学医学部附属病院検査部において、抗体スクリーニングと交差適合試験（ポリエチレングリコール添加間接抗グロブリン試験）で検出されたIgG抗体51例、2) 1)のうち6法で反応した25例と市販ポリクローナル血清12例、3) 抗Jk^a抗体陽性症例、4) IgM抗体11例および5) IgM抗E抗体陽性症例を対象とした。

2. 方法

1) 試験管法は、ポリエチレングリコール(和光純薬、大阪：PEG)、重合アルブミン(Ortho, Raritan, NJ：Al)および低イオン強度溶液(Ortho：LISS)添加抗IgG血清(Ortho)の3法による間接抗グロブリン試験(それぞれPEG-IAT、Al-IAT、LISS-IAT)を行った。

2) カラム法は、BioVue System(Ortho：Bio)とMicro Typing System (DiaMed, Cressier, Switzerland：MTS)の2法を用いた。

3) マイクロプレート法は、Capture R Ready Screen(Immucor, Norcross, GA：CRRS)で行った。

4) 抗原陽性赤血球は、Di^aとJr^a以外は、ホモ接合のものを用いた。

5) 凝集強度の判定は、試験管法はAABBテクニカルマニュアル¹⁾、カラム法およびCRRSはそれぞれ試薬の説明基準に従った。抗体価のスコア化は、AABBテクニカルマニュアル¹⁾に準じて行った。

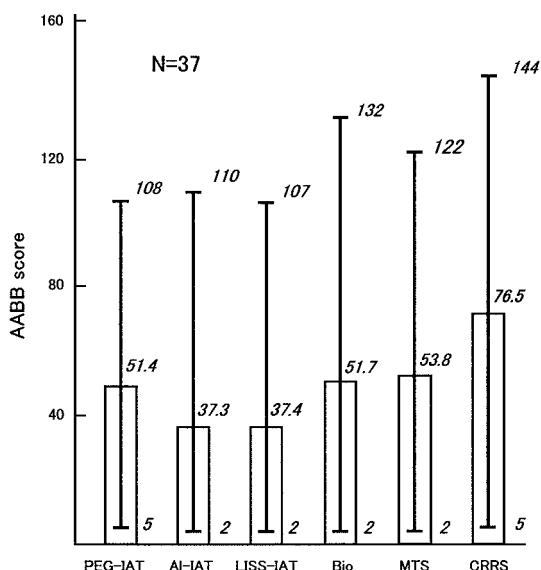


Fig. 1 Comparison of titration reactivity score by various methods

Numbers in italics show minimum, mean and maximum scores of each method.

PEG-IAT, Indirect antiglobulin test using polyethylene glycol ; AI-IAT, Indirect antiglobulin test using polymerise albumin ; LISS-IAT, Indirect antiglobulin test using low ionic strength solution ; Bio, BioVue System ; MTS, Micro Typing System ; CRRS, Capture R Ready Screen.

N = 37 (Commercially available anti-sera, 12 ; Patient sear, 25)

6) 統計処理には, Mann Whitney U 検定を用いた。

III. 結 果

1. 各検査法における陽性率の比較

PEG-IAT で陽性を示した IgG 抗体 51 例を対象として, 他法の陽性率を比較検討した (Table 1). その結果, AI-IAT : 62.7%, LISS-IAT : 68.6%, Bio : 88.2%, MTS : 88.2%, CRRS : 94.1% であった。すなわち, 試験管法の AI-IAT や LISS-IAT に比べ, カラム法 2 法および CRRS の検出感度が高かった。

2. 各検査法における抗体検出感度の比較

IgG 抗体保有患者血清 25 例および市販抗血清 12 例を対象に, 血清を段階希釈後, 凝集強度をスコア化し比較検討した (Fig. 1, Table 2). その結

Table 2 Statistical analysis between various methods

	Method	P value
1	PEG-IAT vs AI-IAT	0.013 *
2	PEG-IAT vs LISS-IAT	0.018 *
3	PEG-IAT vs Bio	0.996
4	PEG-IAT vs MTS	0.816
5	PEG-IAT vs CRRS	0.004 *
6	AI-IAT vs LISS-IAT	0.888
7	AI-IAT vs Bio	0.111
8	AI-IAT vs MTS	0.025 *
9	AI-IAT vs CRRS	0.001 *
10	LISS-IAT vs Bio	0.117
11	LISS-IAT vs MTS	0.029 *
12	LISS-IAT vs CRRS	0.001 *
13	Bio vs MTS	0.705
14	Bio vs CRRS	0.007 *
15	MTS vs CRRS	0.014 *

* : level of significance $P < 0.05$

AI-IAT, Indirect antiglobulin test using polymerise albumin ; LISS-IAT, Indirect antiglobulin test using low ionic strength solution ; PEG-IAT, Indirect antiglobulin test using polyethylene glycol ; Bio, BioVue System ; MTS, Micro Typing System ; CRRS, Capture R Ready Screen.

果, 陽性率と同様に Bio, MTS および CRRS が, AI-IAT や LISS-IAT などの試験管法に比べ高値を示した。

3. Kidd 系抗体における検出感度の比較

PEG-IAT で検出された Kidd 系抗体 5 例 (Table 1 No. 5 の 3 例, No. 8 および 9 の各 1 例) の陽性率は, Bio は 60% (3/5), MTS は 80% (4/5), CRRS は 80% (4/5) であった。

次に, 抗 Jk^a 抗体を保有する乳癌の多発性転移症例を対象とし, 6 法で抗体価の経時的推移を検討した (Fig. 2). 本症例では, 入院時 (2001 年 5 月) の抗体スクリーニング検査は陰性であった。その後, 6 月 23 日, 6 月 28 日に貧血改善のため赤血球濃厚液 400ml の輸血を受けた。7 月 10 日の交差適合試験時に PEG-IAT およびプロメリン法で不適合がみられ, 抗 Jk^a 抗体が検出された。抗体価のスコアは, CRRS : 33, PEG-IAT : 13, MTS : 5, Bio : 2 で, AI-IAT と LISS-IAT では検出されなかった。その後, MTS と Bio では 7 月 26 日にはみられなくなったが, CRRS と PEG-IAT は 8 月

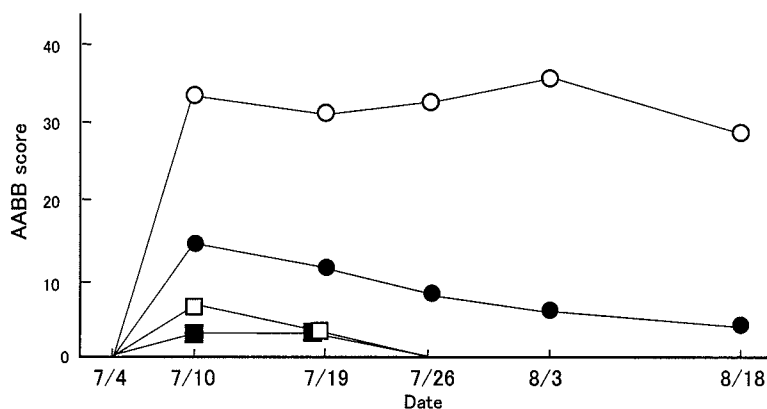


Fig. 2 Changes in titration reactivity score in anti-Jk^a antibody by various methods Capture R ready Screen (CRRS), ○; Indirect antiglobulin test using polyethylene glycol (PEG-IAT), ●; Micro Typing system (MTS), □; BioVue System (Bio), ■. Case: Female, 61-year-old, breast cancer with multiple metastasis. Antibody screening test was negative on admission (7 May 2001). She received 1 pack of 140 ml concentrated red cells 2 times (23 and 28 June 2001). 12 days after blood transfusion, anti-Jk^a antibody was detected.

Table 3 Antibody reactivity of 11 sera containing IgM alloantibodies by various IgG antibody detection methods

Specificity	Test cell antigen	Tube					Column		Microplate
		S	Bro	PEG-IAT	AI-IAT	LISS-IAT	Bio	MTS	CRRS
1 M	MM	1+	NT	±	1+	0	0	0	1+
2 M	MM	1+	NT	1+	2+	±	1+	1+	1+
3 Le ^a	Le (a + b -)	2+	2+	1+	±	±	±	0	0
4 Le ^a	Le (a + b -)	1+	2+	±	±	0	0	0	0
5 Le ^a	Le (a + b -)	1+	2+	±	±	0	0	0	0
6 Le ^a	Le (a + b -)	1+	1+	1+	0	0	0	0	1+
7 Le ^a	Le (a + b -)	1+	2+	2+	0	0	0	0	2+
8 Le ^a	Le (a + b -)	2+	2+	2+	1+	1+	±	0	1+
9 Le ^b	Le (a - b +)	1+	2+	1+	±	±	±	0	0
10 Le ^b	Le (a - b +)	2+	1+	2+	1+	±	1+	0	0
11 Le ^b	Le (a - b +)	2+	2+	2+	1+	1+	±	0	0
		Positive number			9/11	6/11	6/11	1/11	5/11
		Positive ratio (%)			81.8	54.5	54.5	9.0	45.5

S, Saline test; Bro, Bromeline one-step test; PEG-IAT, Indirect antiglobulin test using polyethylene glycol; AI-IAT, Indirect antiglobulin test using polymerise albumin; LISS-IAT, Indirect antiglobulin test using low ionic strength solution; Bio, BioVue System; MTS, Micro Typing System; CRRS, Capture R Ready Screen.

18日まで検出可能であった。

4. IgM 抗体の陽性率の比較

PEG-IAT で陽性を示し、2-メルカプトエタノール処理 (2ME) で反応が消失した IgM 抗体 11 例を対象として、他の 5 法の陽性率を比較検討した (Table 3)。AI-IAT は 81.8% (9/11)、LISS-IAT

と Bio は 54.5% (6/11)、CRRS は 45.5% (5/11) を示したが、MTS は 11 例中 1 例と極めて低値であった。

次に、2ME 処理で凝集が消失する IgM 性抗 E 抗体保有症例 (多発性骨髄腫による寒冷凝集素症で溶血性貧血を伴う) を対象とし、6 法で抗体価の

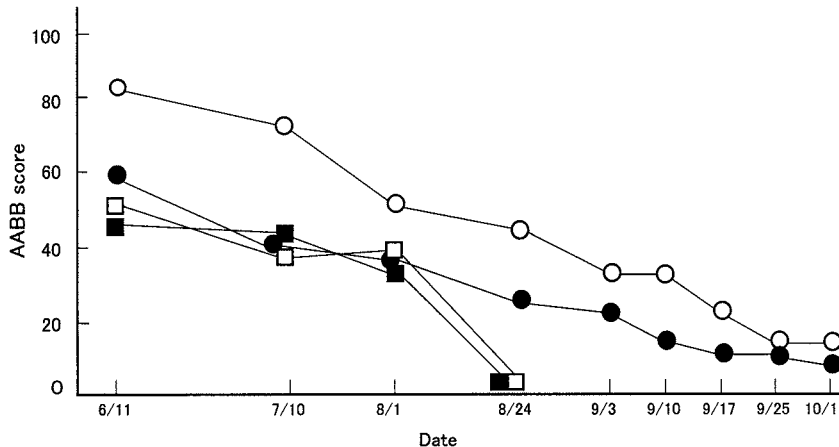


Fig. 3 Changes in titration reactivity score in anti-E antibody by various methods Capture R ready Screen (CRRS), ○; Indirect antiglobulin test using polyethylene glycol (PEG-IAT), ●; Micro Typing system (MTS), □; BioVue System (Bio), ■. Case: Female, 66-year-old, cold agglutinin disease, hemolytic anemia and multiple myeloma. Antibody specificity was not clear due to rouleaux formation on admission (11 May 2001). She received 6 packs of 400 ml washed red cells over 6 days (11–16 May 2001). The specificity of anti-E antibody was detected with a decrease in serum gamma globulin level (1 August 2001).

経時的推移を比較検討した(Fig. 3). 入院時(2001年5月)に、寒冷凝集素価は1,024倍と高値を示し、直接抗グロブリン試験は、抗IgGおよび抗補体血清とも弱陽性であった。抗体スクリーニング検査では、生理食塩液法は3+, プロメリン、アルブミン法は1+, PEG-IATは弱陽性で、赤血球型特異性はなく、連鎖形成(血清免疫グロブリン値, IgG 3,190mg/dl, IgM 823mg/dl, IgA 102mg/dl)によるものと考えられた。貧血改善のため、5月11日から16日までの6日間、洗浄赤血球400mlの輸血を受けたが、その後、8月1日の検査で、抗E特異性がみられたため、患者の保存血清について抗E抗体の推移を検討した。その結果、PEG-IATとCRRSではMTSとBioに比べ、長期に陽性所見が持続した。しかし、Al-IATとLISS-IATでは、抗E抗体は検出されなかった。

IV. 考 察

IgG性同種抗体の検出感度を試験管法3法、カラム法2法およびマイクロプレート法の6法間で比較した。試験管法3法間では、PEG-IATがAl-IATやLISS-IATよりも検出感度が高く従来の

報告²⁾と一致した。

また、カラム法であるMTSとBioの2法と試験管法であるPEG-IATの比較では、同等の検出感度であった。しかし、抗体別にみると、抗Jk^a抗体の抗体価はPEG-IATに比べカラム法2法はともに低かった。そこで、Jk^a抗体保有症例における輸血後の抗体価の推移を6法で比較したところ(Fig. 2)、カラム法では早期に抗体が検出されなくなった。その原因として、Kidd系やDuffy系抗原は発現量が少なく、カラム法では遠心濾過中に抗体の解離が起こり易いためと考えられた^{3,4)}。また、BioとMTSは同じカラム法であるにもかかわらず、Kidd系抗体の陽性率はMTSが高かった。Voakらは、加温時間の延長によりLISSを用いたカラム法の抗体検出感度が上昇すると報告している⁵⁾。Fitzsimmonsらも、加温時間を5分延長すると抗Jk^aや抗Fy^b抗体の検出感度が増強することを見出している⁶⁾。すなわち、Bioで10分、MTSで15分という加温時間の違いが、Kidd系抗体の陽性率に影響していると考えられた。

マイクロプレート法であるCRRSは、試験管法

3法およびカラム法2法に比べ検出感度が高く、Knightらの報告と一致する結果であった⁷⁾。しかし、今回の検討で、CRSSの検出感度はPEG-IATより高いのに、PEG-IAT陽性CRSS陰性例が認められた。このことは、高感度であっても1つ方法だけで臨床的に問題となる全ての抗体を検出することはできないことを意味している。今回は、PEG-IATを基準法としたため、逆にPEG-IAT陰性で他法陽性例の検討はできなかった。しかし、我々はCRSSのみで輸血前患者血清中に抗Jk^b抗体を検出したDHTR症例を経験している⁸⁾。すなわち、PEG-IAT陰性の低力価な抗体を、より高感度なCRSSで検出することで、DHTRを予防できると考えられた。

一方、抗IgG抗体を用いた抗グロブリン試験を行っているのに、IgM抗体が検出されることがある。この現象は、加温や洗浄操作で赤血球から解離するはずのIgM抗体が残存し、凝集を起こすためである³⁾。今回の検討では、カラム法2法とCRSSのIgM抗体陽性率は、試験管法の中でも低かったLISS-IATと同等かそれ以下であった。これら3法は試験管法に比べIgG抗体検出感度が同等かそれ以上であることから、特異性でも優れていた。また、同じカラム法でもBioの54.5% (6/11) に比べMTSでは9.1% (1/11) とIgM抗体を殆ど検出しなかった。その原因は、MTSの加温時間と遠心時間が長いこと、IgM抗体の解離が起こり易く残存抗体量が少なくなったためと考えられた。

輸血検査上、どのような検出感度が必要かは難しい問題であるが、検出感度の高い方法を採用することでDHTRの予防が可能である^{9)~11)}。今回の検討では、試験管法3法の中でも感度の高いPEG-IATに比べ、カラム法の2法およびCRSSは、同等かそれ以上の成績を示しており、有用性が確認された。

文 献

- 1) Vengelen-Tyler, V., ed.: Technical Manual 13th eds., American Association of Blood Banks, Maryland, 1999, 637—647.
- 2) Wenz, B., Apuzzo, J., Shan, D.P.: Evaluation of the Polyethylene glycol-potentiated indirect antiglobulin test. *Transfusion*, 30: 318—321, 1990.
- 3) Weisbach, V., Ziener, A., Zimmermann, R., Glaser, A., Zingsem J Eckstein R: Comparison of the performance of four microtube column agglutination systems in the detection of red cell alloantibodies. *Transfusion*, 39: 1045—1050, 1999.
- 4) Phillips, P.K., Whitton, C.M., Lavin, F.: The use of the antiglobulin“ gel test” for antibody detection. *Transfus. Med.*, 2: 111—113, 1992.
- 5) Voak, D.: The status of new methods for the detection of red cell agglutination. *Transfusion*, 39: 1037—1040, 1999.
- 6) Fitzsimmons, J.M., Morel, P.A.: The effects of red blood cell suspending media on hemagglutination and the antiglobulin test. *Transfusion*, 19: 81—85, 1979.
- 7) Knight, R.C., Poole, G.D. b.: Detection of red cell antibodies: current and future techniques. *Br. J. Biomed. Sci.*, 52: 297—305, 1995.
- 8) 山根和恵, 森尾有孝, 佐々木正照, 渡辺直樹: 抗Jk^b+E抗体により発症した遅発性溶血性輸血副作用の1例, 日輸血会誌, 47: 654—658, 2001.
- 9) Pineda, A.A., Vanvakas, E.C., Gorden, L.D., Winter, J.L., Moore, S.B.: Trend in the incidence of delayed hemolytic and delayed serologic transfusion reaction. *Transfusion*, 39: 1097—1103, 1999.
- 10) 山口富子, 安田広康, 佐藤久美子, 赤間敏子, 加藤久美子, 岩淵伸枝, 大庭 敬, 大戸 斉, 阿部力哉: 複数の抗体(抗C, 抗e, 抗Jk^a, 抗P₁抗体)により短期間に2回連続して発症した遅発性溶血性輸血副作用. 日輸血会誌, 43: 896—900, 1997.
- 11) 佐久間志津枝, 深澤賀寿子, 鈴木隆幸, 安田広康, 赤間敏子, 山口富子, 大戸 斉: 抗Di^a, 抗Jk^b, 抗E抗体により3回の遅発性溶血性輸血副作用を呈した血友病Bと, 病院内システムの改善. 医学検査, 49: 1198—1201, 2000.