

原 著

Prewarm technique は Rh 系抗体の検出率を低下させる

遠藤 輝夫¹⁾ 佐々木正照¹⁾ 古谷 大輔¹⁾ 辻 直樹¹⁾²⁾
小林 大介²⁾ 八木橋厚仁¹⁾²⁾ 渡辺 直樹¹⁾²⁾

¹⁾札幌医科大学附属病院検査部

²⁾札幌医科大学医学部臨床検査医学講座

(平成 16 年 8 月 23 日受付)

(平成 17 年 2 月 4 日受理)

PREWARM TECHNIQUE REDUCES THE DETECTION EFFICIENCY FOR Rh SYSTEM ANTIBODIES

Teruo Endoh¹⁾, Masateru Sasaki¹⁾, Daisuke Furuya¹⁾, Naoki Tsuji¹⁾²⁾,
Daisuke Kobayashi²⁾, Atsuhito Yagihashi¹⁾²⁾ and Naoki Watanabe¹⁾²⁾

¹⁾Division of Laboratory Diagnosis, Sapporo Medical University Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Sapporo Medical University, School of Medicine

Prewarm technique (PW), a method of warming reagents and samples before reaction, is used to prevent the effect of cold-reactive antibodies on the detection of warm-reactive antibodies. However, a recent report indicates the possibility that PW may attenuate the agglutination of red blood cells (RBC) induced by warm-reactive antibodies. In this study, we determined the effect of PW on detection efficiency for Rh system antibodies. We used 38 samples with Rh system antibodies (29 samples with anti-E antibody, 6 with anti-D antibody, 2 with anti-c antibody and 1 with anti-e antibody) which showed a positive reaction on 3 kinds of indirect antiglobulin tests (IAT) including 37°C saline IAT, low ionic strength saline (LISS)-IAT and the Polyethylene glycol (PEG)-IAT or bromelin method.

Reduction of antibody titers induced by the prewarm technique was observed in 46.7% samples and 36.1% of samples tested by 37°C saline IAT and PEG-IAT, respectively. This reduction was observed more frequently in samples tested by LISS-IAT and the bromelin method (60.7% in LISS-IAT and 62.9% in the bromelin method). In samples with lower antibody titers (less than 2-fold), more than 30% of samples showed a negative reaction in LISS-IAT and the bromelin method. We then examined the effect a warming period on the Rh system antibodies-agglutination score. A decrease in agglutination score was observed on warming for 5 min and the extent of this decrease was enhanced at 120 min. In addition, we warmed the RBC suspension and plasma separately, and examined their effect on agglutination score. Since a decrease in agglutination score was observed only when the RBC suspension was warmed, warming of RBC may cause a decrease in warm-reactive antibodies reactivity. These results indicate that PW may attenuate not only cold-reactive antibodies-induced RBC agglutination but also warm-reactive antibodies-induced RBC agglutination.

Key words : Prewarm technique, Rh system antibody

1. はじめに

冷式抗体でもその抗体価が高い場合には、対応抗原を持つ赤血球の37°Cでの凝集を生ずる。そのため、冷式抗体が混在していると温式抗体の検出率が低下する。これまで、冷式抗体の影響を回避する方策として、検体や試薬を前もって37°Cに加温する Prewarm technique (PW) が用いられてきた。しかし、最近、PWを行なうと温式抗体の凝集が弱まる可能性が報告された¹⁾。そこで、今回我々は、PWがRh系抗体の検出率に及ぼす影響を検討した。

2. 対象と方法

2-1 対象

札幌医科大学附属病院で2002年10月から2004年4月までの間に、3種類の間接抗グロブリン試験(37°C 1時間加温法、LISS法、PEG法)とプロメリン法のいずれかで陽性を示した、Rh系抗体保有患者の血漿38例(抗E抗体29例、抗D抗体6例、抗C抗体2例、抗e抗体1例)を用いた。

2-2 PWが凝集強度に及ぼす影響の判定法

PWはMalloryらの方法²⁾に準じ、生理的食塩

液、反応増強試薬(LISS溶液; Ortho-Clinical Diagnostics, PEG溶液; 和光純薬工業, プロメリン溶液; ImmucorGamma), 血漿, 3% O型R1R2 (CcDEe) 赤血球浮遊液(Ortho-Clinical Diagnostics)を、あらかじめ37°Cで30分間加温して行なった。試験管法による間接抗グロブリン試験には、抗ヒトIgGクームス血清(Ortho-Clinical Diagnostics)を用いた。反応量は、血漿100μl, 赤血球浮遊液50μl, LISS溶液とPEG溶液各100μl, プロメリン溶液50μl, 抗ヒトIgGクームス血清100μlとした。反応時の加温時間は、37°C 1時間、LISS法、PEG法およびプロメリン法は15分間とした。結果は、倍数希釈した血漿と赤血球浮遊液との凝集強度をAABBの凝集スコア(4+を12, 3+を10, 2+を8, 1+を5, ±を3)³⁾に換算し、その総和を求めて評価した。有意差は、Wilcoxon signed-rank testを用いて検定した。

2-3 フローサイトメトリー法

赤血球(3×10^6 個/10μl)に10μlの血漿とLISS, PEGまたはプロメリン溶液を加えて37°C, 30分間反応後、PBSで3回洗浄した。2次抗体にはFITC標識ラビット抗ヒトIgG F(ab)₂(DAKO)

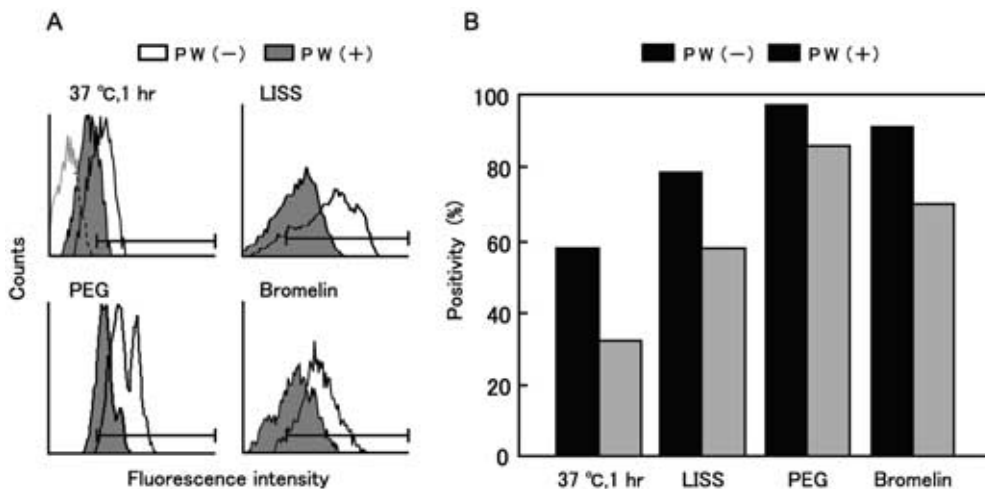


Fig. 1 Effect of PW on the binding of Rh system antibodies to RBC

(A) Rh system antibodies-positive RBC were determined using flow cytometry. Anti-E antibody-positive plasma was used in this study. (B) Percentage of Rh system antibodies-binding RBC. RBC with a fluorescence intensity exceeding that of E antigen-negative RBC were defined as Rh system antibodies-binding RBC.

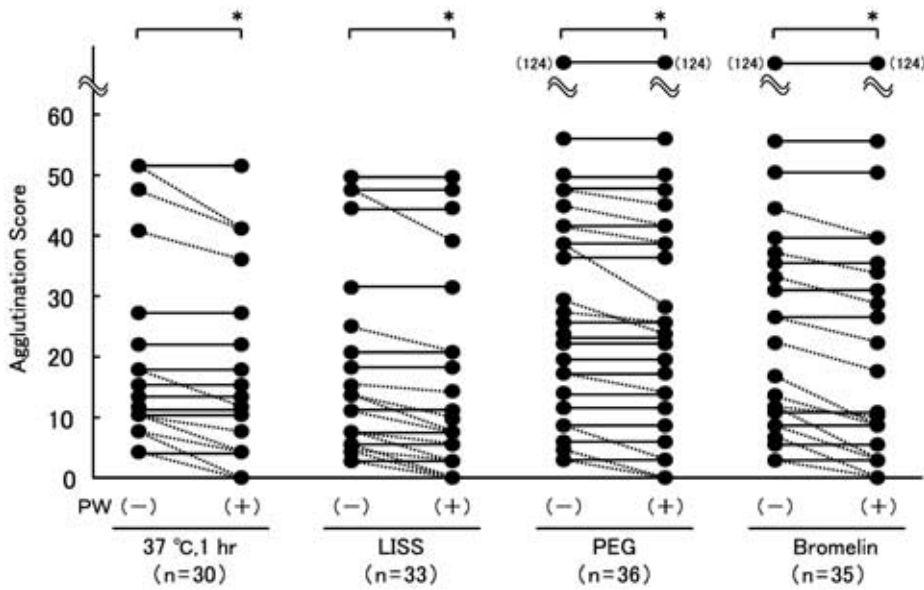


Fig. 2 Effect of PW on Rh system antibodies-agglutination score
 Solid lines indicate samples in which PW did not affect agglutination score.
 Broken lines indicate samples in which PW decreased agglutination score.
 *, $p < 0.01$ by the Wilcoxon signed-rank test. Numbers in parentheses indicate agglutination score values above the break in the Y-axis.

Table 1 Frequency that PW decreased agglutination score

	37°C, 1 hr	LISS	PEG	Bromelin
Number of samples tested	30	33	36	35
Number of samples in which PW decreased agglutination score	14	20	13	22
Frequency (%)	46.7	60.7	36.1	62.9

Table 2 Frequency that samples with lower antibody titer (less than 2-fold) showed negative reactions following PW

	37°C, 1 hr	LISS	PEG	Bromelin
Anti C	1 (1) *	1 (1)	1 (2)	1 (1)
Anti D	0 (1)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
Anti E	5 (15)	5 (14)	3 (7)	5 (12)
Anti e	0 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (1)
Total	6 (18)	6 (19)	4 (13)	7 (17)
Frequency (%)	33.3	31.6	30.8	41.2

* Numbers in parentheses indicate the number of samples tested

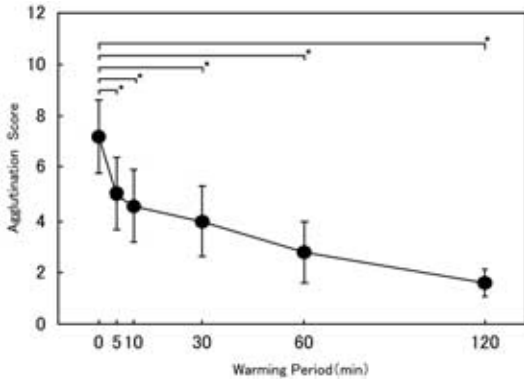


Fig. 3 Effect of warming period on Rh system antibodies-agglutination score
 *, $p < 0.01$ by the Wilcoxon signed-rank test. Data represents mean \pm S.D.

を用い、15分間反応後、フローサイトメーター (Coulter EPICS XL・MCL, BECKMAN COULTER) で解析した。

3. 結 果

3-1 PWがRh系抗体の赤血球への結合に及ぼす影響

まず、抗E抗体保有患者血漿を用いて、PWが凝集に及ぼす影響をフローサイトメトリー法で調べた。PWを行なった際のヒストグラムは、すべての方法で未加温時に比べ左側へシフトした (Fig. 1)。また、E抗原陰性赤血球の蛍光強度をカットオフとして、陽性細胞数を求めたところ、PWで約10~30%減少した (Fig. 1)。すなわち、PWで抗E抗体の赤血球への結合が低下することが明らかになった。そこで、Rh系抗体保有患者38例を対象に、PWが凝集スコアに及ぼす影響を

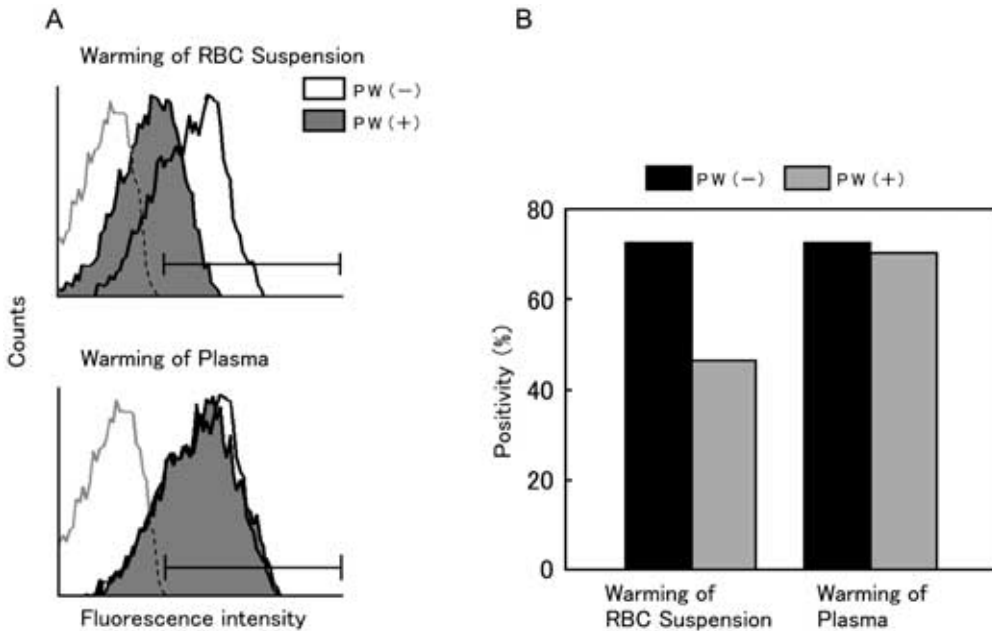


Fig. 4 Effect of warming of RBC suspension or warming of anti E antibody-positive plasma on the detection of Rh system antibodies
 (A) Rh system antibodies-binding RBC were determined using flow cytometry. The LISS method was performed with warming of RBC suspension (upper figure) or warming of anti E antibody-positive plasma (lower figure).
 (B) Percentage of Rh system antibodies-positive RBC. RBC with a fluorescence intensity exceeding that of E antigen-negative RBC were defined as Rh system antibodies-binding RBC.

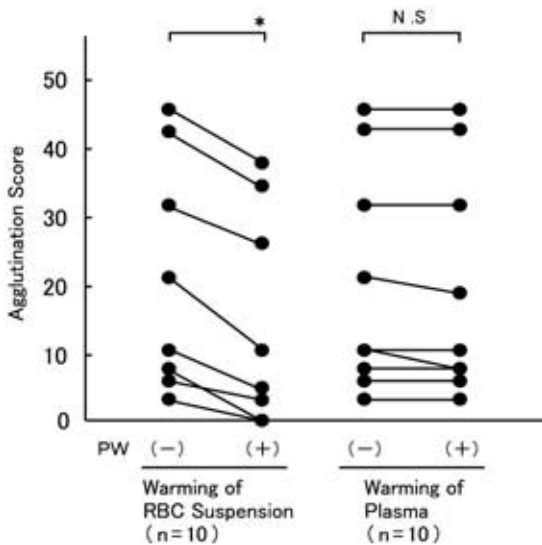


Fig. 5 Effect of warming of RBC suspension or warming of anti E antibody-positive plasma on Rh system antibodies-agglutination score

*, $p < 0.01$; N.S., not significant by the Wilcoxon signed-rank test.

検討した。その結果、すべての検出方法でPWによる凝集スコアの低下が認められた (Fig. 2)。PWによる凝集スコアの低下頻度には検出法ごとに差異がみられ、なかでも、LISS法とプロメリン法でそれぞれ60.7%、62.9%と高頻度であった (Table 1)。

3-2 低抗体価検体がPWで陰性化する頻度

各検出法で低抗体価 (2倍以下) であった検体を対象として、PWで陰性化する頻度を調べた。最も少ないPEG法でも30.8%であり、プロメリン法では41.2%が陰性化した (Table 2)。

3-3 PWの加温時間が凝集スコアに及ぼす影響

LISS法で凝集スコアの低下がみられた17例を対象に、加温時間の影響を解析した (Fig. 3)。その結果、加温5分目から凝集スコアの有意な低下が認められ、その程度は120分まで経時的に増大した。

3-4 赤血球浮遊液および抗E抗体陽性血漿のPWが凝集に及ぼす影響

凝集スコアの低下原因を明らかにするため、赤血球浮遊液と抗E抗体陽性血漿とを別々に加温

し、LISS法でその影響を検討した。その結果、赤血球浮遊液を加温した際にのみ抗E抗体の赤血球への結合が約30%低下した (Fig. 4)。そこで、10例のRh系抗体陽性血漿 (抗Cおよび抗D抗体各2例、抗E抗体5例、抗e抗体1例) を対象に、赤血球浮遊液と血漿を別々に30分間加温し、凝集スコアの変化を未加温時と比較した (Fig. 5)。その結果、赤血球浮遊液加温時には、未加温時に比べ凝集スコアが有意に低下した。一方、血漿のみ加温した場合には差異がみられなかった。すなわち、PWによる凝集スコアの低下は、赤血球の加温が原因と考えられた。

4. 考 察

PWは特殊な試薬を必要とせず、簡便に冷式抗体の影響を回避できるため汎用されている。今回我々は、PWによってRh系抗体の赤血球への結合が低下することを見出した。また、その影響には検出法ごとに差異がみられ、プロメリン法やLISS法でより顕著であった。この一因として、両法が赤血球膜を強く障害することが挙げられる。一方、Legerら¹⁾は、間接抗グロブリン試験の際に最もPWの影響を受けるのはPEG法であったと報告している。我々の結果と異なった理由は不明であるが、対象とした抗体の力価の違いが考えられる。すなわち、Legerらの検討ではPEG法だけで検出される低力価の抗体¹⁾が23例中7例含まれていたのに対し、我々は36例中1例に過ぎなかった。

ところで、これまでPWがRh系抗体の赤血球への結合を抑制する機序は不明であった。今回の検討で、赤血球浮遊液をPWした場合にのみ抗体の結合が阻害されたことから、その一因が加温による赤血球の抗原性減弱であることが明らかになった。しかし、影響を受けない検体も3割から6割みられた。すなわち、個々の患者が保有する抗体の特異性が関与している可能性も否定できない。

いずれにしても、現状では、Rh系抗体を検出する際には、PWの影響が比較的少ない37℃1時間加温法やPEG法を選択することが望ましいと考えられる。しかし、2倍以下の低抗体価検体では両

方法であってもその30%が陰性化するので注意を要する。我々の検討では5分間の加温でも、明らかな凝集抑制が認められており、今後、Rh系抗体の検出率を低下させず、冷式抗体の影響のみを回避できる加温条件の検討が望まれる。

文 献

- 1) Leger RM & Garratty G : Weakening or loss of antibody reactivity after prewarm technique. *Transfusion*, 43 : 1611—1614, 2003.
 - 2) Mallory D : Controversies in transfusion medicine. Prewarmed tests Pro-why, when, and how-not if. *Transfusion*, 35 : 268—270, 1995.
 - 3) Virginia Vengelen-Tyler, ed. : Technical manual 13th ed., American Association of Blood Banks, Bethesda, 1999, 646.
 - 4) Barrett VJ, Stubbs JR, Stuardi K, Hollis A, Clear L : Analysis of the routine use of polyethylene glycol (PEG) as an enhancement medium. *Immunohematol*, 11 : 11—13, 1995.
-