

原 著

## カラム凝集法による ABO 血液型うら試験弱反応検体の解析

日高 陽子<sup>1)</sup> 川田 典子<sup>1)</sup> 奥田 誠<sup>1)</sup> 加藤 禎<sup>1)</sup>  
栗林 智子<sup>1)</sup> 小山 信彌<sup>2)</sup> 小原 明<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東邦大学医療センター大森病院輸血部

<sup>2)</sup>循環器センター

(平成 16 年 11 月 2 日受付)

(平成 17 年 6 月 20 日受理)

### ANALYSIS OF WEAK REACTION SAMPLES IN REVERSED TYPING WITH COLUMN AGGLUTINATION TECHNOLOGY

Yoko Hidaka<sup>1)</sup>, Noriko Kawata<sup>1)</sup>, Makoto Okuda<sup>1)</sup>, Tadashi Kato<sup>1)</sup>,  
Tomoko Kuribayashi<sup>1)</sup>, Nobuya Koyama<sup>2)</sup> and Akira Ohara<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Blood Transfusion, Toho University Omori Medical Center

<sup>2)</sup>Department of Cardiology, Toho University Omori Medical Center

The automated blood group testing system based on column agglutination technology (CAT) does not provide a standard for reversed typing. If the tube test (TT) method standard is introduced into automated the CAT method, the frequency of confirmation testing with the TT method will increase. In this study, we compared the results of the CAT and TT methods using samples which produced weak results with the automated CAT method (reactivity < 3+; AutoVue System, Ortho).

Forty-five percent of weak samples showed an increase in agglutination reactivity after a fixed 3-minute incubation time with the manual CAT method (BioVue, Ortho). All 481 weak samples had greater than 3+ reactivity with the TT method. Eighty percent of weak samples possessed IgM antibody. Titration and scoring results with the TT method were greater than with the manual CAT method for all samples. Titration and scoring of the weak samples were low with all methods for all samples. In conclusion, we propose that 1+ reactivity in the automated CAT method requires a confirmation test with the TT method because CAT 2+ samples can present as 3+ with the TT method.

**Key words** : Column agglutination technology, Tube test, Reversed typing, Weak agglutination

#### はじめに

東邦大学大森病院輸血部では、2001年11月より全自動輸血検査システム AutoVue (Ortho社) (以下、AutoVue)を導入した。AutoVueは試験管法 (tube test 以下、TT法)とは異なるビーズカラム凝集法 (column agglutination technology 以下、CAT法)である<sup>1)</sup>。当院では当初、ABO血液型うら試験 (以下、うら試験) に TT法の再検基準を

用いて 2+以下を再検対象とした。その結果、再検率は約 7.7%と高頻度となり、該当検体の TT法による再検結果はすべて 3+以上であった。

CAT法は TT法と比べ弱い反応を示すことが報告されている<sup>2)-5)</sup>。そこで我々は AutoVueでうら試験の結果が 2+以下の検体を対象として、弱い反応の要因を解析し、当院における CAT法の再検基準を設けることとした。

## 対象および方法

### 1. 検討対象

2002年11月から2003年4月までの間にAutoVueで血液型検査を行った検体10,964例中,うら試験の反応が2+以下の検体(以下,弱反応検体)845例から,無作為に抽出した検体を検討対象とした.弱反応検体の比較対照として,AutoVueでうら試験の反応が3+以上の検体(以下,通常反応検体),およびDithiothreitol(以下,DTT)処理を行いIgG抗体検体と確認した臍帯血を用いた.

### 2. 方法

#### (1) TT法うら試験

日本臨床衛生検査技師会・輸血検査標準化部会により呈示された方法<sup>6)</sup>(以下,輸血検査の実際)に準じた検査を行った.判定用遠心機はCF-III(Ortho社,東京),ABO血液型うら試験用試薬はアファーマジェン(Ortho社)を使用した.血漿に試薬を分注した後,遠心までの時間(以下,反応時間)は30秒とし,室温(25℃)で反応させた.

#### (2) CAT法うら試験

BioVue System(以下,BioVue)(Ortho社)を使用し,カセットはうら試験用のリバースカセット(Ortho社)を使用した.ABO血液型うら試験用試薬,反応時間,反応温度はTT法と同じ条件とした.

#### (3) DTT処理

輸血検査の実際<sup>7)</sup>に準じた検査を行った.DTTで血漿が希釈されるため,対照検体としてDTTの代わりに生理食塩水を加えた血漿(以下,PBS対照)を用いて,凝集の強さを比較した.PBS対照と比較し,DTT処理した方の凝集が弱くなった検体は,IgM抗体が存在していると判断した.

#### (4) 抗体価・凝集スコア値の測定

輸血検査の実際<sup>8)</sup>に準じた検査を行い,凝集スコア値はAABBテクニカルマニュアル<sup>9)</sup>に従い求めた.

#### (5) 再検率の比較

対象検体10,964例中AutoVueうら試験の再検査基準を2+以下とした場合と,1+以下とした場合の再検率を比較した.

## 結果

### 1. CAT法による反応時間の影響

AutoVueによる遠心までの反応時間の影響を,弱反応検体99例を対象として観察した.BioVueを用い,うら試験の反応時間を30秒・3分に設定した.弱反応検体のうち,反応時間30秒でAutoVueと同じ反応を示した検体は93%(92/99例),反応が増強した検体(1+ 2+, 2+ 3+)は6%(6/99例),反応が減弱した検体(2+ 1+)は1%(1/99例)であった.反応時間3分でAutoVueと同じ反応を示した検体は55%(54/99例),反応が増強した検体(1+ 2+, 2+ 3+)は45%(45/99例),反応が減弱した検体は0%(0/99例)であった(Table 1).

### 2. TT法による再検査

AutoVueによる弱反応検体481例に対してTT法によるうら試験を行い,反応を比較したところ,すべての弱反応検体がTT法の再検査で3+以上の反応を示した(Table 2).

### 3. 臍帯血を用いたCAT法とTT法の比較

臍帯血68例を用いてCAT法とTT法でうら試験を行い,反応を比較した.臍帯血では,CAT法の反応がTT法を上回る検体(CAT法>TT法)は76%(52/68例),CAT法がTT法と等しい検体(CAT法=TT法)は24%(16/68例),CAT法がTT法を下回る検体(CAT法<TT法)は0%(0/68例)であった.

### 4. DTT処理による抗体性状の分類

弱反応検体194例・通常反応検体100例それぞれをDTT処理し,TT法を行い次の3群に分類した.1)検出感度以下となった検体(以下,IgM抗体検体),2)PBS対照と比較し反応が減弱した検体(以下,IgM+IgG抗体検体),3)PBS対照と同じ反応の検体(以下,IgG抗体検体).その結果,弱反応検体の80%(155/194例)がIgM抗体検体と判定され,IgM+IgG抗体検体は20%(39/194例),IgG抗体検体は0%(0/194例)であった.これに対して通常反応検体は83%(83/100例)がIgM+IgG抗体検体であり,IgM抗体検体は17%(17/100例),IgG抗体検体は0%(0/100例)であった.

Table 1 Effect of incubation time on agglutination reactivity

Reaction shift	Methods and Reaction		Incubation time	
	AutoVue	BioVue	30 sec	3 min
Decrease	2 +	1 +	1	0
Same	1 +	1 +	92	54
	2 +	2 +		
Increase	1 +	2 +	6	45
	2 +	3 +		

AutoVue weak samples (n = 99) were reanalyzed with the manual CAT method (BioVue) under the fixed incubation times of 30 sec and 3 min.

Table 2 TT reactions of CAT weak samples.

		CAT				
		0	W +	1 +	2 +	total
TT	0	0	0	0	0	0
	W +	0	0	0	0	0
	1 +	0	0	0	0	0
	2 +	0	0	0	0	0
	3 +	0	8	39	90	137
	4 +	0	1	16	327	344
total		0	9	55	417	481

All CAT weak samples (n = 481) had greater than 3+ reactivity with the TT method.

The oblique dashed line shows equivalence (CAT = TT)

### 5. CAT法とTT法の抗体価・凝集スコア値の比較

結果4で抗体性状の分類された弱反応検体から、無作為にIgM抗体検体75例・IgM+IgG抗体検体23例を選んだ。さらに通常反応検体からIgM抗体検体9例・IgM+IgG抗体検体27例を選んで、抗体価・凝集スコア値をCAT法・TT法で測定し比較した。まず弱反応検体の抗体価を免疫グロブリンクラスの性状別に検査法で比較すると(Table3 1), IgM抗体検体の50%(37/75例)はTT法がCAT法より高値となり, CAT法が高値となるのは9%(7/75例)にすぎなかった。IgM+IgG抗体検体は, CAT法が高値となったのは22%(5/23例)・TT法が高値となったのも22%(5/23例)と差がなかった。通常反応検体では(Table3 2), IgM抗体検体は常にTT法が高

値となった。IgM+IgG抗体検体は59%(16/27例)がTT法高値となった。

弱反応検体の凝集スコア値を免疫グロブリンクラスの性状別に検査法で比較すると(Fig. 1), IgM抗体検体の99%(74/75例)はTT法がCAT法より高値であった。IgM+IgG抗体検体は83%(19/23例)がTT法高値となり, CAT法が高値となったのは13%(3/23例)であった。通常反応検体では, すべてのIgM抗体検体でTT法が高値となった。IgM+IgG抗体検体は70%(19/27例)がTT法高値となり, CAT法が高値となったのは26%(7/27例)であった。

27例の臍帯血はすべての検体で, 抗体価・凝集スコア値共にCAT法が高値であった。

### 6. 再検率の比較

AutoVueうら試験で2+以下を再検査とする

Table 3 1 Comparison of titer obtained with CAT and TT in weak samples.

		< IgM type samples >						< IgM + IgG type samples >					
		CAT						CAT					
		x 1	x 2	x 4	x 8	x 16	total	x 1	x 2	x 4	x 8	x 16	total
TT	x 1						0	x 1					0
	x 2	1	2				3	x 2		1			1
	x 4		9	20	7		36	x 4			6	4	10
	x 8	1	3	20	8		32	x 8			5	6	11
	x 16				3	1	4	x 16					0
	total	2	14	40	18	1	75	total	0	1	11	10	1
		CAT > TT : 9%			Average titer			CAT > TT : 22%			Average titer		
		CAT < TT : 50%			CAT : x 4.7			CAT < TT : 22%			CAT : x 6.2		
		CAT = TT : 41%			TT : x 6.3			CAT = TT : 61%			TT : x 6.0		
		P < 0.05						P = 0.82					

Blood group antibody in the weak samples was differentiated into IgM type and IgM + IgG type samples. The oblique dashed lines show equivalence (CAT = TT)

Table 3 2 Comparison of titer obtained with CAT and TT in normal samples.

		< IgM type samples >							< IgM + IgG type samples >									
		CAT							CAT									
		x 1	x 2	x 4	x 8	x 16	x 32	total	x 1	x 2	x 4	x 8	x 16	x 32	x 64	x 128	x 256	total
TT	x 1							0	x 1									0
	x 2							0	x 2									0
	x 4							0	x 4									0
	x 8							0	x 8		1	3						4
	x 16			2	1			3	x 16			1	5	2	2			10
	x 32				2	3		5	x 32			1	1	4	2	2		11
	x 64						1	1	x 64							1		1
	total	0	0	2	3	3	1	9	x 128								1	1
		CAT > TT : 0%			Average titer				CAT > TT : 19%			Average titer						
		CAT < TT : 100%			CAT : x 12.4				CAT < TT : 59%			CAT : x 32.2						
		CAT = TT : 0%			TT : x 30.2				CAT = TT : 22%			TT : x 27.3						
		P < 0.05							P = 0.66									

Blood group antibody in the normal samples was differentiated into IgM type and IgM + IgG type samples. The oblique dashed lines show equivalence (CAT = TT)

と,10,964 例中 845 例が再検査対象となり,再検査率は 7.7% となった.1+ 以下を再検査とすると 65 例が再検査対象であり 0.6% となった.

考 察

自動化された輸血検査システムの普及に伴い, CAT 法と TT 法のうら試験の反応の違いについて様々な報告がある.それらは,CAT 法の装置・カセットの特性,AutoVue リーダーの判定基準に由来するためなどと報告されているが<sup>4,5)</sup>,うら試

験の弱反応検体に関する解析は報告されていない.今回我々は,検査法の特異性・抗体の性状を解析することで反応の違いの要因を推測し,独自の再検査基準を設けた.

AutoVue では血球試薬と患者検体を分注後,遠心までの反応時間がその都度異なっている.我々が反応時間を測定した結果,一度に検査する検体数により 30 秒から 4 分と差が認められた.そこで,BioVue で反応時間を 30 秒・3 分の 2 点に固

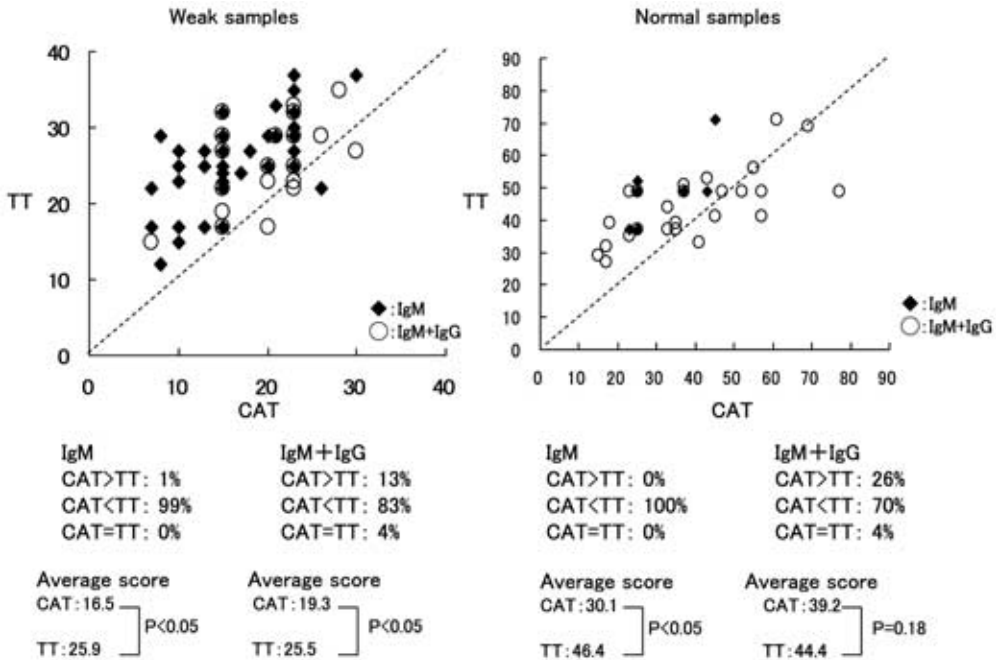


Fig. 1 Scores of weak and normal samples by CAT and TT.

定して検査し, AutoVue との反応を比較した. 反応時間 30 秒では反応が増強する検体は 6% であったのに対し, 3 分では 45% の検体で反応の増強を認めた. 反応時間を長くすることで反応が増強したと考えられる. すなわち, AutoVue では検査時に十分な反応時間が得られれば, 弱反応検体は減少すると推測された.

TT 法と CAT 法では遠心の目的が異なっている. TT 法の遠心 (1,000g/3,400rpm) は, 血球を強制的に近づける目的がある<sup>10)</sup>. 一方 CAT 法は 2 段階の遠心操作が行われ, まず 2 分間の低速遠心 (55g/800rpm) で検体・試薬混合物を反応槽内からカラム上部へ出来るだけ静かに移動させ, 血球をガラスビーズ上に横一列に並べる. 次に 3 分間の高速遠心 (200g/1,500rpm) で血球がガラスビーズを通過する<sup>1)</sup>. つまり TT 法では物理的に凝集を強くさせるための遠心であるが, CAT 法では移動・通過させるための遠心である. よって, 同じ検体でも凝集は異なり, CAT 法は TT 法より反応が弱くなると推測された.

臍帯血を CAT 法で検査すると, TT 法よりも常

に強い凝集を認めた. 臍帯血中の抗体は, ほとんどが母体由来の IgG 抗体であることから, 抗体の性状も CAT 法の反応を左右する要因であると推測した.

そこで, 弱反応検体・通常反応検体を DTT 処理し, IgM 抗体検体と IgM + IgG 抗体検体, IgG 抗体検体に分類したところ, 弱反応検体の 80% が IgM 抗体と判定された.

弱反応検体は抗体の性状に関係なく, すべて TT 法による再検査で反応が増強し 3+ 以上を示した. CAT 法はカラム内に Polyethylene glycol (以下, PEG) を充填し, IgG 抗体の検出感度を上げている. したがって, IgM 抗体検体が 80% を占める弱反応検体では CAT 法で検出感度が増強されないため, 弱反応になると推測された.

弱反応検体の抗体価・凝集スコア値とともに, TT 法が CAT 法より高値となった. しかし, IgM + IgG 抗体検体では抗体価に有意差は認められなかった ( $p = 0.82$ ). これは, IgG 抗体を含むことで CAT 法の反応が増強し, CAT 法の抗体価が TT 法より高値となる検体があるためと推測される.

また, IgM + IgG 抗体検体が CAT 法・TT 法のどちらが高値を示すかは, 検体の IgG 抗体の含有量により左右されると考えられた。

弱反応検体と通常反応検体の平均抗体価・平均凝集スコア値を比較すると, 弱反応検体は通常反応検体と比較し, 低抗体価・低凝集スコア値であった。また, TT 法で 4+, CAT 法で 0.5+ となった検体の抗体価は 4 倍以下であったとの報告<sup>11)</sup>があることから, 低抗体価・低凝集スコア値の検体は CAT 法で 2+ 以下の反応になりやすいと考えられた。

AutoVue うら試験の再検基準を 2+ 以下から 1+ 以下にすることで, 再検率は 0.6% と検査業務上受け入れられる頻度に低下する。AutoVue で 1+ の凝集を示した検体も TT 法の再検査で 3+ 以上の反応を示すが, 亜型の不規則抗体の可能性も考慮し, 当院では 1+ 以下を再検対象とすることとした。

### まとめ

我々は, 弱反応検体は CAT 法の原理, 抗体の性状, 抗体価・凝集スコア値の影響などから, TT 法で 3+ 以上の反応を示す検体が AutoVue では 2+ 以下の反応になると考えた。従って当院では AutoVue の再検基準を 1+ 以下とした。

### 文 献

- 1) Reis, K.J., et al. : Column agglutination technology. *Transfusion*, 33 : 639-643, 1993.
- 2) 石田萌子, 他: 輸血検査におけるカラム凝集法の導入 取り扱い上の注意点 . 機器・試薬, 20 (6): 863-873, 1997.
- 3) 古谷裕美, 他: 自動輸血検査システム AutoVue 導入による輸血検査 24 時間体制の現状と問題点 . 日輸血学会誌, 49 (3): 455-460, 2003.
- 4) 寺岡敦子, 他: 当院における自動化機器導入の現状 . 日輸血会誌, 45 (6): 929-931, 1999.
- 5) 宮子 博, 他: 自動輸血検査装置 ID-GelStation の使用経験 試験管法及び AutoVue との比較検討 . 日輸血学会誌, 49 (5): 666-672, 2003.
- 6) 輸血検査標準化部会: 輸血検査の実際, 改定第 3 版, 日本臨床衛生検査技師会編, 東京, 2002, 16.
- 7) 輸血検査標準化部会: 輸血検査の実際, 改定第 3 版, 日本臨床衛生検査技師会編, 東京, 2002, 96-97.
- 8) 輸血検査標準化部会: 輸血検査の実際, 改定第 3 版, 日本臨床衛生検査技師会編, 東京, 2002, 35.
- 9) Vengelen-Tyler, ed : Technical Manual 13th ed. Bethesda, MD : American Association of Blood Banks, 1999, 646-647.
- 10) Vengelen-Tyler, ed : Technical Manual 13th ed. Bethesda, MD : American Association of Blood Banks, 1999, 255-256.
- 11) 遠藤俊彦, 他: AutoVue System 導入による血液型関連二次検査の検討 . 血液事業, 25 (1) : 17-23, 2002.