

ポリエチレングリコールとアルブミンを用いた間接抗グロブリン法の比較： 抗体検出頻度，抗体特異性，遅発性溶血性輸血副作用発生率の検討

奥津 美穂 斎藤 俊一 小野 智 小幡 悠子 渡部 和也
馬場千華子 本田 睦子 郡司 陽子 三浦 里織 佐藤久美子
川畑 絹代 安田 広康 遠山ゆり子 菅野 隆浩 大戸 斉

赤血球不規則抗体スクリーニングにおける間接抗グロブリン試験の反応増強剤をアルブミンからポリエチレングリコールへ切り替えたことによる不規則抗体の検出感度について retrospective に比較検討した。

1990～1996年に不規則抗体検査を行った25,947患者（実数）と1997～2003年に不規則抗体検査を行った23,039患者（実数）を比較した。

赤血球同種抗体陽性率は，Alb-IATでは，1.07%，PEG-IATでは1.16%であり有意差は認められなかった。しかし，抗体の特異性は，PEG-IATでは，抗E，抗Jk^aがより多く検出され(p<0.05)，抗Le^bの検出は少なかった(p<0.01)。遅発性溶血性輸血副作用（DHTR）は16例で観察された（Alb-IAT期10例，PEG-IAT期6例）。DHTR関連抗体として，抗Rh，抗Jk^aが多く検出された。

DHTR関連抗体は，PEG-IATの方が多く検出されたが，PEG-IATがDHTRを防ぐ検査法としてAlb-IATよりも有用であるとは証明されなかった。

キーワード：間接抗グロブリン試験，アルブミン，ポリエチレングリコール，遅発性溶血性輸血副作用

はじめに

赤血球輸血療法を安全に行うため，赤血球不規則抗体スクリーニングは溶血性輸血副作用を防止するうえで重要な検査である。臨床的に意義のある赤血球不規則抗体検出には，間接抗グロブリン試験（Indirect antiglobulin test）がもっとも信頼される方法¹⁾である。反応増強剤は，溶液のイオン強度を下げ静電結合を増強させるアルブミン（Albumin）や低イオン強度生理食塩液（Low-ionic strength salt solution；LISS）²⁾，立体的排他現象により免疫複合体形成を促進させるポリエチレングリコール（Polyethylene glycol）³⁾などがあるが，使用する反応増強剤は各施設によって様々である。アルブミン増強間接抗グロブリン試験（Albumin-enhanced indirect antiglobulin test；Alb-IAT）とポリエチレングリコール増強間接抗グロブリン試験（Polyethylene glycol-enhanced indirect antiglobulin test；PEG-IAT）による不規則抗体検出感度を retrospective に検討した。

対象と方法

1) 対象

1990年から1996年までの7年間にプロメリン（Br）法とAlb-IATを用いて不規則抗体スクリーニング検査を実施した25,947患者と1997年から2003年までの7年間にBr法とPEG-IATを用いた23,039患者を対象とした。両法の検査件数は実数であるが，両期間に重複して検査を行っていた患者は両期間にそれぞれ1件として検討した。

2) 方法

不規則抗体スクリーニング検査は，間接抗グロブリン試験，生理食塩液法，酵素法（プロメリン1段法：Br法）の3法を併用して検査を行った。

Alb-IATは反応増強剤に重合ウシアルブミン液（pH 7.2，蛋白濃度24.0%，オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス）を用い，PEG-IATでは，ポリエチレングリコール（20% [w/v]，当院自家調製⁴⁾）を用いて検査を行った。両法は成書に従い，標準的な試験管法で実施した⁵⁾。反応増強剤は両法とも2滴添加した。感作後の洗浄は，Alb-IATでは3回，PEG-IATでは4回行った。

Table 1 Number of alloantibodies detected by Alb-IAT or PEG-IAT

Antibody specificity	Alb-IAT	PEG-IAT	p
Rh-E	79	96	< 0.05
Other Rh than E	34	47	< 0.05
Jk ^a	6	9	NS
Jk ^b	2	9	NS
Dj ^a	13	10	NS
Le ^a	84	81	NS
Le ^b	23	5	< 0.01
MNS system	25	17	NS
P ₁	34	23	NS
Others	15	10	NS

Alb-IAT: Albumin-enhanced indirect antiglobulin test, PEG-IAT: Polyethylene glycol-enhanced indirect antiglobulin test, NS: not significant.

Table 2 Alloantibodies detected by Alb-IAT or PEG-IAT within 90 days after transfusion

	Alb-IAT	PEG-IAT	p
Number of transfusion recipients	4,158	4,651	NS
Number of new alloantibodies detected posttransfusion [95%CI]	39 (0.94%) [0.645 ~ 1.235%]	33 (0.71%) [0.470 ~ 0.952%]	NS
DHTR [95%CI]	10 (0.24%) [0.092 ~ 0.380%]	6 (0.13%) [0.026 ~ 0.232%]	NS
DSTR [95%CI]	5 (0.12%) [0.039 ~ 0.281%]	2 (0.04%) [0.005 ~ 0.155%]	NS

95%CI: 95% Confidence interval, DHTR: Delayed hemolytic transfusion reaction, DSTR: Delayed serologic transfusion reaction, NS: not significant.

3) 統計

統計学的な解析は、Fisher's Exact Method を用いて評価し、 $p < 0.05$ の場合を有意とした。

結 果

1) Alb-IAT と PEG-IAT の不規則抗体検出感度と抗体特異性の比較

赤血球不規則性抗体の検出率は Alb-IAT では 1.07% (277/25,947, 95%CI: 0.93~1.23%) であり、PEG-IAT では、1.16% (268/23,039, 95%CI: 1.02~1.30%) であった。両法間の陽性率に有意な差は認められなかった。赤血球不規則性抗体の特異性を Table 1 に示す。両法ともに、抗 Rh 系、抗 Lewis 系、抗 P₁ の検出が多く検出された。しかし、抗体の特異性を比較すると、PEG-IAT では Alb-IAT に比べ、抗 Rh 系と抗 Jk^a の検出が有意に多く ($p < 0.05$)、抗 Le^b では有意に少なかった。 ($p < 0.01$)。

2) 輸血後不規則抗体検出の比較

当院で施行した輸血により産生した赤血球不規則性抗体が輸血後 90 日以内に検出された頻度 (Table 2) は Alb-IAT では 0.94% (39/4,158)、PEG-IAT では 0.71% (33/4,651) であった。輸血後に新たに産生された (検出レベルに上昇したものも含む) 不規則抗体の検出率には有意な差は認められなかった。遅発性溶血性輸血副作用 (Delayed hemolytic transfusion reaction: DHTR) を発症したのは Alb-IAT で 10 例 (0.24%)、PEG-IAT では 6 例 (0.13%) であった。PEG-IAT で少ない

傾向はあるが、両法間に有意差は認められなかった。また、輸血後に溶血等副作用症状は無く、生体内で輸血赤血球と産生あるいは増加した抗体による抗原抗体反応のために直接抗グロブリン試験 (Direct antiglobulin test: DAT) が陽性となる遅発性血清学的輸血反応 (Delayed serologic transfusion reaction: DSTR)⁶⁾ は Alb-IAT では 5 例 (0.12%)、PEG-IAT では 2 例 (0.04%) に検出された。やはり、PEG-IAT で少ない傾向はあるが、両法間に有意差は認められなかった。

輸血後に、初めて不規則抗体が検出されるまでの Br 法と Alb-IAT、Br 法と PEG-IAT の検出期間を比較した (Table 3)。Br 法と Alb-IAT 使用期間では、17 例が Br 法と Alb-IAT で同時に検出したが、15 例は Alb-IAT の法が早期に、6 例は Br 法の方が早期に不規則抗体を検出した。Br 法での検出が先行した 6 例は全て Rh 系抗体であった。そのうち、2 例は DSTR であった。Br 法で検出後、Alb-IAT 陽性になるまでに要した日数は平均 9.3 日 (5~20 日) であった。Br 法と PEG-IAT 使用期間では、20 例は同時に、13 例は PEG-IAT が先行し、Br 法が先行した症例は 1 例も認められなかった。

3) DHTR の不規則抗体の特異性

DHTR 発症例の不規則抗体の特異性を示す (Table 4)。両法とも Rh 系抗体による DHTR が最も多く、次いで Kidd 系抗体が多く検出された。Alb-IAT 期の抗 Jk^a による DHTR 症例⁷⁾ は、Alb-IAT では検出されなかったが、発症後に PEG-IAT では検出された。

Table 3 Comparison of sensitivity in antibody screening: Bromelin vs. Alb-IAT and Bromelin vs. PEG-IAT

A				B			
		Alb-IAT				PEG-IAT	
		+	-			+	-
Bromelin	+	17	6 *	Bromelin	+	20	0
	-	15	0		-	13	0

Bromelin: Bromelin-one-stage method for antibody detection.

*: All 6 showed anti-Rh in specificity.

Table 4 Specificity of alloantibodies detected by Alb-IAT or PEG-IAT in DHTR

(Alb-IAT)		(PEG-IAT)	
Case No.	specificity of antibodies	Case No.	specificity of antibodies
1	anti-Jk ^b	11	anti-E
2 *	anti-c	12	anti-E + anti-c
3	anti-E + anti-c	13	anti-Jk ^a
4	anti-E + anti-c	14	anti-E + anti-Jk ^a + anti-P ₁
5	anti-S + anti-P ₁	15	anti-E
6	anti-E + anti-S	16	anti-E + anti-c + anti-Jk ^a + anti-Bg ^a + anti-Bg ^c
7 *	anti-E		
8 *	anti-S		
9 *	anti-e + anti-Jk ^a + (anti-P ₁)**		
10	anti-E + anti-c + anti-Fy ^b + anti-M		

*: Cases (No. 2, 7, 8 and 9 in Alb-IAT) with other alloantibodies were detected before transfusion. **: cold-reactivity antibody.

考 察

反応増強剤の違いにより、不規則抗体の検出率や特異性に差があるかを検討するため、不規則抗体スクリーニングに Br 法と Alb-IAT を採用していた7年間と Br 法と PEG-IAT を採用していた7年間について比較した。不規則抗体の検出率は Alb-IAT、PEG-IAT 期間とも同等であったが、特異性でみると PEG-IAT では抗 Rh、抗 Jk^a の検出が多く、抗 Le^b の検出率が低かった。抗 Le^b の主体は IgM であり、PEG-IAT では IgM 抗体の反応が弱くなるためであると考えられる。PEG-IAT を不規則抗体スクリーニング法としての有用性を、プロスペクティブに評価⁹⁾し、採用を決定した。今回の検討においても、同様に、PEG-IAT は Alb-IAT よりも臨床的に意義のある不規則抗体を高感度に検出していた。

同種赤血球輸血後の新たな不規則抗体の出現は、Alb-IAT、PEG-IAT とも赤血球輸血患者の1% 以下であった。また、抗体検出に要する期間を Br 法と比較すると Alb-IAT では、6 例の Rh 系抗体検出時期が Br 法より遅かった。しかし、PEG-IAT では Br 法より遅れて検出された抗体は無かった。酵素法である Br 法は、特に Rh 系の初期抗体の検出に優れていると言われて⁵⁾いる。しかし、Br 法と PEG-IAT では検出に差が認められなかったことから、PEG-IAT は Br 法を併用した Alb-IAT と同等以上の検出能を有するとも考えられる。

DHTR は、ABO 式血液型以外の血液型不適合による溶血性輸血副作用であり、多くは輸血赤血球の抗原刺激で再感作された抗体が増加することにより惹き起こされる⁹⁾。最近では初感作の抗体による DHTR の報告もある^{10)~12)}。今回の観察では DHTR に関連したと考えられる抗体は、抗 Rh、抗 Kidd など臨床的に意義があるものが大部分であった。

高感度な不規則抗体検出検査法を採用することにより、DHTR 予防効果を高めることが期待できる¹³⁾¹⁴⁾。DHTR 関連抗体として頻度の高い抗 Rh 系、抗 Jk^a の検出には PEG-IAT が Alb-IAT より高感度であったが、今回の我々の検討では PEG-IAT は DHTR を防ぐ検査法として Alb-IAT より有用であるとの確証は得られなかった。

文 献

- 1) 赤血球型検査ガイドライン. 日本輸血学会雑誌, 49 : 398—402, 2003.
- 2) AABB : 赤血球抗原抗体反応とそれらの検出. Technical Manual 13TH edition (日本語版), オリnbパス工業, 271—290, 2002.
- 3) Wenz B, Apuzzo DP: Evaluation of the polyethylene glycol-potentiated indirect antiglobulin test. Transfusion, 30: 318—321, 1990.
- 4) 渡部和也, 竹内千華子, 横田睦子, 他: 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. 日本輸血学会誌, 48: 342—349, 2002.
- 5) 社団法人日本臨床衛生検査技師会: 不規則抗体検査. 日本臨床衛生検査技師会ライブラリー XII 輸血検査の実際 第3版, 東京, 48—60, 2002.
 - 6) Ness PM, Shirey RS, Thoman SK, et al: The differentiation of delayed serologic and delayed hemolytic transfusion reactions: incidence, long-term serologic findings, and clinical significance. *Transfusion*, 30: 688—693, 1990.
 - 7) 山口富子, 安田広康, 佐藤久美子, 他: 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. 日本輸血学会誌, 43: 896—900, 1997.
 - 8) 山口富子, 安田広康, 佐藤久美子, 他: 不規則抗体スクリーニングにおけるポリエチレングリコール試験の評価: プロスペクティブ研究. 日本輸血学会誌, 45: 462—465, 1999.
 - 9) 遠山 博, 柴田洋一, 前田平生, 他: 溶血性輸血副作用. 輸血学, 第3版, 中外医学社, 東京, 531—587, 2004.
 - 10) 石丸 健, 天満智佳, 藤原義一, 他: 一次免疫応答より惹起されたと考えられる遅発性溶血性輸血副作用の1症例. 日本輸血学会誌, 50: 768—773, 2004.
 - 11) 北澤淳一, 猪股真喜子, 鎌田千鶴, 他: 一次免疫応答により産生された抗C+e抗体による遅発性溶血性輸血副作用を呈した1例. 日本輸血学会誌, 51: 594—600, 2005.
 - 12) Redman M, Regan F, Contreras M: A prospective study of the incidence of red cell allo-immunization following transfusion. *Vox Sang*, 71: 216—220, 1996.
 - 13) Pineda AA, Vamvakas EC, Gorden LD, et al: Trends in the incidence of delayed hemolytic transfusion reactions and delayed serologic transfusion reaction. *Transfusion*, 39: 1097—1103, 1999.
 - 14) 佐々木正照, 山田美加子, 金子礼子, 他: 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. 日本輸血学会誌, 49: 640—645, 2003.

COMPARISON OF THE POLYETHYLENE GLYCOL-ENHANCED AND ALBUMIN-ENHANCED INDIRECT ANTIGLOBULIN TESTS: RETROSPECTIVE STUDY OF THE FREQUENCY AND SPECIFICITY OF ANTIBODIES DETECTED AND FREQUENCY OF DELAYED HEMOLYTIC TRANSFUSION REACTIONS

Miho Okutsu, Syunichi Saito, Satoshi Ono, Yuko Obata, Kazuya Watanabe, Chikako Baba, Mutsuko Honda, Yoko Gunji, Saori Miura, Kumiko Sato, Kinuyo Kawabata, Hiroyasu Yasuda, Yuriko Tohyama, Takahiro Kanno and Hitoshi Ohto

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

Abstract:

We compared the albumin-enhanced indirect antiglobulin test (Alb-IAT) and polyethylene glycol-enhanced IAT (PEG-IAT) for their detection rate and specificity of irregular antibodies, and the frequency of delayed hemolytic transfusion reactions (DHTR).

Screening and identification for irregular antibodies were performed using Alb-IAT in 25,947 patients from 1990 to 1996 and PEG-IAT for 23,039 patients from 1997 to 2003. The rates of irregular antibodies detected by the two methods were not statistically different, at 1.07% for Alb-IAT and 1.16% for PEG-IAT. In contrast, the rates of detection of anti-E and anti-Jk^a by PEG-IAT was significantly higher than that by Alb-IAT ($p < 0.05$), whereas the rate for anti-Le^b was lower ($p < 0.01$). The frequency of DHTR was not statistically different during the use of between Alb-IAT (10 cases, 0.24%) and PEG-IAT (6 cases, 0.13%).

PEG-IAT was more sensitive than Alb-IAT in detecting clinically significant antibodies such as anti-Rh and anti-Kidd. However, no significant decrease in DHTR in transfusion recipients was observed.

Keywords:

Indirect antiglobulin test, Albumin, Polyethylene glycol, Delayed hemolytic transfusion reaction