

## ABO 血液型不適合造血幹細胞移植後のドナー型赤血球検出の至適条件

尾崎 牧子<sup>1)</sup> 二宮 早苗<sup>1)</sup> 土手内 靖<sup>1)</sup> 西山 記子<sup>1)</sup> 谷松 智子<sup>1)</sup>

西山 政孝<sup>1)</sup> 和泉 賢一<sup>2)</sup> 牟田 毅<sup>2)</sup>

我々は、ABO 血液型不適合造血幹細胞移植後の患者のドナー型赤血球の検出が、全自動輸血検査システム (AutoVue) では試験管法に比べ一定の期間遅れることを経験してきた。この遅れの原因を検討するため、A 型の HLA 完全一致、非血縁ドナーから骨髄移植を受けた O 型の 1 症例を対象とし、比重差で分離した赤血球の最上層、上層、中層、および下層について A 型赤血球産生回復の推移を検討した。A 型赤血球は day32 に、AutoVue では最上層のみに検出された。試験管法では被凝集価は、全体で 32 倍であった。また、分離検体では、最上層は 64 倍と上層、下層の 8 倍に比べ有意に高かった。day35 には AutoVue で A 型赤血球は下層にも検出され、上下層の差は移植 2 カ月後に消失した。ドナー型赤血球は移植後早期には、網赤血球を含め比重の小さい若い赤血球の割合が多いため、赤血球の上層部に多く検出されると考えられた。AutoVue におけるドナー型赤血球の検出の遅れは、AutoVue が遠心分離後の赤血球の最下層を吸引するためと判明した。

ABO 血液型不適合造血幹細胞移植後の患者のドナー型赤血球の早期確認のためには、遠心分離後の赤血球の最上層を用い、そのモニタリングは赤血球層全体をよく混和したものをを用いることが、効果的かつ正確である。

キーワード：AutoVue, 比重, 造血幹細胞移植, ABO 血液型不適合移植, 網赤血球

### はじめに

我々は、ABO 血液型不適合造血幹細胞移植後のドナー型赤血球産生回復の確認検査を、試験管法による定量検査とカラム凝集法を用いた全自動輸血検査システム (AutoVue) (オーソ・クリニカルダイアグノスティック社；以下、OCD 社) で行い、移植後早期の一定の期間、ドナー型赤血球が試験管法で検出されるのに対し、AutoVue では検出されないことを経験してきた。今回、両法の乖離の原因を赤血球の比重に着目して検討し、移植後早期のドナー型赤血球の検出のための至適条件を見出したので、報告する。

### 対象および方法

#### 1. 対象

対象は、42 歳、男性、急性リンパ性白血病に対し ABO 血液型主不適合 (本人 O 型、ドナー A 型) 非血縁者間骨髄移植を施行された。HLA は完全一致、ドナーの採取有核細胞数は  $2.40 \times 10^8$ /kg、CD34<sup>+</sup>細胞数は  $2.50 \times 10^6$ /kg であった。骨髄液からの赤血球の除去は、連続式血液成分分離装置 COM.TEC (Fresenius 社) を用いて、比重遠心法により行った。

#### 2. 方法

##### 1) A 型赤血球の検出感度における基礎的検討

A 型健常者 3 名の赤血球液および O 型健常者 3 名の赤血球液をそれぞれ混和して得た A 型プール赤血球液、O 型プール赤血球液を作成して両者を混合し、全体に占める A 型赤血球液の割合が 0~10% になるよう調整し、抗 A 試薬との反応性を AutoVue と試験管法で観察した。

##### 2) 披検赤血球の比重差による分離

患者の赤血球 (濃縮赤血球) を、全体を混和した一部 (全体)、遠心分離後の表面の薄層 30 $\mu$ l (最上層)、および残りの部分を 3 分割したもの (上層、中層、下層) に分離し、各層の A 型赤血球産生回復の推移を、AutoVue と試験管法で観察した。

##### 3) AutoVue による A 型赤血球の測定方法

AutoVue による A 型赤血球の測定は、オーソバイオビュー抗 A、抗 B、抗 D カセット (OCD 社) を用いて測定した。赤血球の最上層は量が少ないため、3% 赤血球浮遊液を作成し検体とした。他の層は分離した各赤血球層を直接用いた。A 型赤血球量は、基本的に AutoVue の自動判定結果をもとに無、少量、中等量、多量

1) 松山赤十字病院検査部

2) 松山赤十字病院内科

[受付日：2010 年 2 月 8 日、受理日：2010 年 6 月 9 日]

Table 1 Comparison of sensitivity in detection of donor type RBCs : AutoVue vs. tube test

A1 RBCs (%)	0	1	2	3	4	5	6	7	10
AutoVue	(-)	(-)	+ <sup>mf</sup> S	+ <sup>mf</sup> S	+ <sup>mf</sup> S	+ <sup>mf</sup> S	+ <sup>mf</sup> M	+ <sup>mf</sup> L	+ <sup>mf</sup> L
tube test	(-)	W+	W+	W+	W+	1+	2+ <sup>mf</sup>	4+ <sup>mf</sup>	4+ <sup>mf</sup>

RBCs : red blood cells S : small amounts of A1 RBCs M : medium amounts of A1 RBCs L : large amounts of A1 RBCs mf : mixed field

と表した。

#### 4) 試験管法による A 型赤血球の測定方法

試験管法は、モノクローナル抗 A 試薬 (OCD 社) 80  $\mu$ l に赤血球浮遊液 30 $\mu$ l を加え、1 分間静置後、3,400 回転 15 秒遠心して判定した。赤血球浮遊液は、最上層は AutoVue で用いたものと同一のものとし、他の層は AutoVue が作成したものをマイクロプレートから採取して用いた。被凝集価の測定は、抗 A 試薬を生理食塩液で 2 倍連続希釈し各層の赤血球浮遊液と反応させ、凝集が見られた最高希釈倍数を被凝集価とした。凝集スコアは AABB のテクニカルマニュアル<sup>1)</sup>に準じた。

#### 5) 血漿抗 A 抗体価の測定方法

患者血漿を生理食塩液で 2 倍連続希釈し、A 型健常者 3 名の赤血球液を混和して得た 3% プール赤血球浮遊液と反応させ、生理食塩液法による最高希釈倍数を IgM 型の抗体価とした。また、患者血漿を DTT (Dithiothreitol) で処理し、間接抗グロブリン法による最高希釈倍数を IgG 型の抗体価とした。

#### 6) 網赤血球の測定方法

網赤血球の移植後の推移は、多項目血液分析装置 XE-2100 (Sysmex 社) を用いて測定した。赤血球各層の網赤血球は、視算法 (プレッカー法<sup>2)</sup>) で測定した。

#### 7) 直接抗グロブリン試験

患者赤血球各層の直接抗グロブリン試験は、オーソバイオビュー抗 IgG カセット (OCD 社) を用いて、カラム凝集法で実施した。

## 成 績

### 1. AutoVue における A 型赤血球の検出感度 (試験管法との比較)

本検討に入る前の基礎的検討として、AutoVue における A 型赤血球の検出感度を調査し、試験管法と比較した。A 型赤血球は AutoVue では 2% から検出可能であった。2~5% は少量 (+<sup>mf</sup>, S), 6% は中等量 (+<sup>mf</sup>, M), 7% 以上は多量 (+<sup>mf</sup>, L) に検出された。一方、試験管法では 1% から検出可能であり、反応の強さは 1~4% は W+, 5% は 1+, 6% は 2+<sup>mf</sup>, 7% 以上は 4+<sup>mf</sup> であった (Table 1)。AutoVue における A 型赤血球の検出感度は、試験管法とほぼ同等であった。

### 2. 赤血球各層の A 型赤血球および血漿抗 A 抗体価、網赤血球の推移

A 型赤血球は AutoVue、試験管法では day31 まで認められなかった (Table 2)。しかし、day32 において、AutoVue で、赤血球層全体では抗 A との反応が陰性であり A 型赤血球は認められなかったが、最上層では抗 A に対し明瞭な部分凝集像を示す多量の存在が認められた。上層、下層では認められなかった。試験管法でも A 型赤血球は、全体では 32 倍 (2+<sup>mf</sup>) であったが、最上層では 64 倍 (2+<sup>mf</sup>)、上層、下層では 8 倍 (1+)、であり、最上層の被凝集価が上層、下層に比べ有意に高かった。day35 では、AutoVue で下層においても A 型赤血球が認められた。以後日数の経過とともに赤血球層全体の A 型赤血球量は増加し、AutoVue で最上層のみに多量に認められていた A 型赤血球が、day42 では上層に、day46 では中層に、day60 では下層にも多量に認められるようになった。最上層と下層の A 型赤血球量の差もしだいに小さくなり、day32 では試験管法で 3 管差あったが、day60 では 1 管差となった。また、赤血球層全体における A 型赤血球量は、常に最上層から下層の量のほぼ平均的な値となっていた。

血漿中の抗 A は、A 型赤血球量の増加に伴い減弱し、IgG 型抗 A が移植前は 256 倍であったが、day 15 では 32 倍、day 35 では 8 倍、day42 では 1 倍以下となった。

網赤血球は、day 15 では 2.6% であったが、day22 では 16.8%、day32 では 62.6% と漸増し、day42 では 87.2% であった。

### 3. 赤血球層各層の直接抗グロブリン試験および網赤血球量

day35 の赤血球層各層の直接抗グロブリン試験の結果は、最上層 1+, 上層 0.5, 下層は陰性、day42 では最上層、上層とも 0.5, 中層、下層は陰性であった。

day42 の赤血球層各層の網赤血球量は、全体 81%、最上層 109%、上層 96%、中層 29%、下層 27% と最上層、次いで上層に多く、中層、下層は少なかった。また、対照とした網赤血球量の多い一般検体についても、網赤血球は、全体 75%、最上層 131%、上層 93%、中層 67%、下層 49% と上層部ほど多かった。

Table 2 Detection of donor type RBCs in four layers separated according to the specific gravity of each

post transplant day	-7	15	22	31		32		35		37		42		46		60	
detection method of A <sub>1</sub> antigen on RBCs	T	T	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T
RBCs all layers	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2+mf ×32 36	+mf M	2+mf ×64 44	+mf L	4+mf ×128 76	+mf L	4+mf ×256 79	+mf L	4+mf ×1,024 104	+mf L	4+mf ×512 105
thin top layer	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+mf L	2+mf ×64 35	+mf L	4+mf ×128 83	+mf L	4+mf ×128 76	+mf L	4+mf ×512 112	+mf L	4+mf ×2,048 124	+mf L	4+mf ×1,024 112
upper layer	NT	NT	NT	(-)	NT	(-)	1+mf ×8 14	+mf S	2+mf ×32 30	+mf M	4+mf ×128 72	+mf L	4+mf ×512 105	+mf L	4+mf ×1,024 109	+mf L	4+mf ×512 103
middle layer	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+mf S	2+mf ×16 28	+mf M	4+mf ×128 69	+mf M	3+mf ×128 68	+mf L	4+mf ×512 97	+mf L	4+mf ×512 103
bottom layer	NT	NT	NT	(-)	NT	(-)	1+mf ×8 11	+mf S	2+mf ×32 30	+mf S	2+mf ×128 49	+mf S	3+mf ×128 65	+mf M	4+mf ×512 96	+mf L	4+mf ×512 109
anti-A	IgM IgG	×32 ×256	×4 ×32	×4 ×32	NT		NT	×1 ×8		NT		×1 ×1 <sub>≥</sub>		NT		×1 ×1 <sub>≥</sub>	
reticulocyte (%)	NT	2.6	16.8	53.4		62.6		82.8		85.1		87.2		80.4		NT	

We selected a patient with blood type O, transplanted from a donor with blood type A. Abbreviations are as follows: RBCs, red blood cells; NT, not tested; T, tube test; A, AutoVue (column agglutination test); mf, mixed field.

Patient's packed RBCs (mixed all named all layers) were separated into several parts, namely the thin top layer, and upper, middle, and bottom layer, according to the specific gravity of each.

AutoVue shows A<sub>1</sub> RBC amounts as follows: small (S), medium (M), and large (L). A tube test shows A<sub>1</sub> RBC amounts as follows: strength of reaction, agglutination titer, and agglutination score. The IgM isotype of anti-A from the patient's plasma was detected using a saline tube test. After treatment with dithiothreitol, the IgG isotype of anti-A from the patient's plasma was detected using the indirect antiglobulin test.

### 考 察

ABO 主不適合骨髄移植(患者 O 型, ドナー A 型)後の患者の赤血球層を, よく混和した全体および比重差から得られる最上層から下層にかけての 4 層に分け, 各層の A 型赤血球量を AutoVue と試験管法で観察した. その結果, 両法で A 型赤血球が初めて検出された day 32 から一定の期間, A 型赤血球は最上層が最も多く下層ほど少ないことが判明した. AutoVue は直接抗グロブリン試験の感度が高いことが知られている<sup>3)</sup>が, AutoVue による直接抗グロブリン試験の day35, day42 における結果はともに, 最上層, 上層で陽性, 下層では陰性であった. IgG 型抗 A 抗体価は day35 が 8 倍, day 42 は 1 倍以下であり, この微量の抗 A が赤血球上の A 抗原に感作し直接抗グロブリン試験が陽性になったと考えられ, この直接抗グロブリン試験の結果も, A 型赤血球が上層部に多いことを証明していた. A 型赤血球量の最上層と下層の差は, day32 では試験管法で 3 管差あったが, 日数が経過し A 型赤血球量が増加するにつれてその差は小さくなり, 約 1 カ月後の day60 では認められなくなった. 一方, 赤血球層全体にお

ける A 型赤血球量は, 常に最上層から下層にかけての量のほぼ平均的な数値を示しており, 移植後のドナー型赤血球量の推移を的確に表していた.

赤血球は若いものほど水分と酵素に富み比重が小さく, 老化するにつれ水分と酵素を失い比重が大きくなる<sup>4)5)</sup>. 網赤血球は骨髄で造られ最初に末梢血に送り出された幼若赤血球であり<sup>6)</sup>, 比重が小さく本症例や一般検体において赤血球の最上層, 次いで上層に多く下層では少なかった. AutoVue, 試験管法で検出され始めた時期のドナー型赤血球の分布は, この網赤血球の分布と類似しており, この時期のドナー型赤血球のほとんどは網赤血球をはじめとする比重の小さい若い赤血球であることが示唆された. さらに, 日数が経過しこの若い赤血球が成熟し比重が大きくなると, ドナー型赤血球はより下層で多く検出されるようになり, 一方で, 生着幹細胞からの赤血球産生が持続して活発であったため, 上層に若い赤血球が観察され続けることで順次, 上層と下層の差は小さくなったと考えられた. 本症例は, 移植後の赤血球回復の指標とされる網赤血球 10%以上<sup>7)8)</sup>となるのに要した日数が 22 日と, ABO 主

不適合移植例で報告されている  $37 \pm 15$  日<sup>8)</sup>に比べて短く、赤血球産生の回復は比較的早かったといえる。ドナー型赤血球量の赤血球各層に差異がある期間は、赤血球産生の回復速度、産生量により異なると推測され、本症例では赤血球産生の回復が早かったため約1カ月間と比較的短期間であったが、回復速度が遅くまた産生量が少なければ、より長期にわたると考えられた。

AutoVue は A 型赤血球が初めて検出された day32 において、通常の赤血球吸引部位である最下層ではこれを検出できなかったが、最上層では検出できていた。移植後早期に AutoVue でドナー型赤血球を検出できない理由は、AutoVue の赤血球吸引部位にあり、AutoVue は、口径 0.3mm のプローブが他層のコンタミネーションなく遠心分離後の赤血球層の管底付近の  $10\mu\text{l}$  を吸引するため、この位置にドナー型赤血球が存在するようになるまでの一定の期間、これを検出できないと考えられた。一方、試験管法においても、検査の都度赤血球層の任意の部分を採用して用いれば、結果にばらつきが生じることになる。従って、いかなる方法で移植後のドナー型赤血球を検出する場合においても、一定の期間、その分布に比重差が生じていることを念頭において、検体を採取する必要があると考えられた。

## 結 語

ABO 血液型不適合造血幹細胞移植後の患者の、ドナー型赤血球の検出における AutoVue と試験管法の検査結果の乖離を契機に、比重差で分離した患者の赤血球各層における、ドナー型赤血球産生回復の推移を検討し、移植後のドナー型赤血球の検出における至適条件を見

出した。

ドナー型赤血球は、移植後早期には比重の小さい若い赤血球の割合が多いため、赤血球の上層に多く下層に少ない。また、この現象は、一定の期間持続した。従って、移植後のドナー型赤血球の早期確認のためには、遠心分離後の赤血球の最上層を、モニタリングは、赤血球層全体をよく混和したものをを用いることが、いかなる方法においても、効果的かつ正確であると考えられた。

## 文 献

- 1) American association of blood banks : Technical manual 13th edition (日本語版), 文祥堂, 東京, 2002, 688—690.
- 2) 平野正美: ビジュアル臨床血液形態学, 南江堂, 東京, 1999, 88—91.
- 3) 菅野直子, 小幡 隆, 小野崎文子, 他: カラム凝集法による赤血球凝集反応—試験管法, ピーズ法, ゲル法の比較検討—, 医学検査, 49: 951—955, 2000.
- 4) 柴田 進: 図解血液病学, 金芳堂, 京都, 1996, 2—7.
- 5) 三輪史郎: 血液病学, 文光堂, 東京, 1981, 73—74.
- 6) 三輪史郎: 血液病学, 文光堂, 東京, 1981, 36—37.
- 7) Braine HG, Sensenbrenner LL, Wright SK, et al: Bone marrow transplantation with major ABO blood group incompatibility using erythrocyte depletion of marrow prior to infusion. Blood, 60: 420—425, 1982.
- 8) 小寺良尚, 加藤俊一: 必携造血幹細胞移植—わが国のエビデンスを中心に—, 医学書院, 東京, 2004, 12—13.

## OPTIMUM CONDITIONS FOR THE DETECTION OF DONOR-TYPE ERYTHROCYTES AFTER ABO-MISMATCHED ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION

*Makiko Ozaki*<sup>1)</sup>, *Sanae Ninomiya*<sup>1)</sup>, *Yasushi Doteuchi*<sup>1)</sup>, *Noriko Nishiyama*<sup>1)</sup>, *Satoko Tanimatsu*<sup>1)</sup>, *Masataka Nishiyama*<sup>1)</sup>, *Kenichi Izumi*<sup>2)</sup> and *Tsuyoshi Muta*<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, Matsuyama Red Cross Hospital

<sup>2)</sup>Department of Internal Medicine, Matsuyama Red Cross Hospital

### **Abstract:**

Our experience in several cases has suggested that the use of the fully automated compatibility testing system AutoVue to detect donor-type antigens on red blood cells (RBCs) early after ABO-mismatched allogeneic stem cell transplantation (SCT) causes a delay compared to the use of the tube test. In this study, we investigated the differences between the two methods.

We selected a patient with blood type O who underwent bone marrow transplantation (BMT) from an HLA-matched sibling donor with blood type A. We centrifuged the patient's blood and separated the RBCs as follows: the thin top layer, and the upper, middle, and bottom layers according to the specific gravity of each. We then investigated the level of A<sub>1</sub> antigen on RBCs in each layer. On day 32 after BMT, AutoVue could detect A<sub>1</sub> antigen abundantly only in the thin top layer. The tube test estimated the titer of A<sub>1</sub> antigen as  $\times 32$  before centrifugation, but after centrifugation as  $\times 64$  in the thin top layer, compared to  $\times 8$  in the other layers. On day 35, AutoVue could detect A<sub>1</sub> antigen in the bottom layer. Two months after BMT, AutoVue and the tube test detected equal A<sub>1</sub> antigen titer from the upper to bottom layers. We speculate that most of the donor RBCs remained immature within the early reticulocyte stage with low-level gravity early after BMT, so they were concentrated abundantly in the upper layer after centrifugation. Using AutoVue, a sample is generally aspirated from the bottom layer RBCs after centrifugation, which might delay the detection of donor-type antigens early after BMT.

In conclusion, using the thin top layer of RBCs might allow much earlier detection of donor-type antigens after SCT. Further, monitoring of donor-type antigens may be better done using whole RBCs that are mixed well.

### **Keywords:**

AutoVue, specific gravity on centrifugation, stem cell transplantation, ABO mismatched transplantation, reticulocyte