

抗 M (IgM+IgG) において抗体価測定時に反応増強剤無添加間接抗グロブリン試験で一部陰性を示した妊婦の 1 例

山田麻里江¹⁾ 山田 尚友¹⁾ 久保田 寧²⁾³⁾ 木村 晋也³⁾ 東谷 孝徳¹⁾
末岡榮三朗¹⁾²⁾

反応増強剤を使用した不規則抗体検査では、冷式抗体の持ちこしが原因で間接抗グロブリン試験が陽性となることをしばしば経験する。冷式抗体の持ちこしを回避し、臨床的意義のある不規則抗体であるかの判別に、反応増強剤無添加間接抗グロブリン試験（以下 60min-IAT）が利用されている。今回、IgM 型抗 M の結合が IgG 型抗 M の結合を抑制したため、60min-IAT の反応が陰性化した可能性が示唆された症例を経験したので報告する。症例は、初回妊娠時に IgM 型抗 M、第一子出産後に IgM+IgG 型抗 M を検出した。3 回目の妊娠時、妊娠中期から出産前日まで 2 週間毎に抗 M 抗体価を測定した。妊娠 37 週で、抗 M 抗体価が 64 倍まで上昇したが、希釈系列の 1 倍、2 倍希釈血清での 60min-IAT は陰性であった。フローサイトメトリー (FCM) の解析では、IgM 型抗 M は低温度域より 37℃ でよく反応する抗体であった。IgM 型抗体の結合が IgG 型抗体の結合を抑制し、IAT 時の抗 IgG グロブリン血清との架橋ができなかった可能性が示唆された。本症例のような不規則抗体の場合は、ジチオスレイトール (Dithiothreitol : DTT) 処理や 2-メルカプトエタノール (2-Mercaptoethanol : 2-ME) 等により IgM 型抗体を破壊して、臨床的意義のある抗体を検出することが有用と思われる。

キーワード：間接抗グロブリン試験, 抗 M, 新生児溶血性疾患, 妊娠, フローサイトメトリー

緒 言

不規則抗体検査や交差適合試験において、反応増強剤を使用した間接抗グロブリン試験 (indirect antiglobulin test : IAT) は、冷式抗体の持ちこしにより陽性となることをしばしば経験する¹⁾。このような抗体を保有した患者への輸血は、反応増強剤無添加間接抗グロブリン試験（以下 60min-IAT）で陰性の場合、適合血の選択は必要ないとされている²⁾。また不規則抗体などの抗体価測定においても、60min-IAT を用いて評価する。

今回、われわれは、IgM+IgG 型抗 M を保有した妊婦の抗 M 抗体価を測定した際に、60min-IAT で希釈系列の 1 倍、2 倍希釈血清は陰性であったが、4 倍希釈血清から凝集がみられた症例を経験した。60min-IAT への IgM 型抗 M の関与について、フローサイトメトリー (Flow Cytometry : FCM) 法を加えた検討を行ったので報告する。

症例と経過

26 歳妊婦。血液型は A 型 RhD 陽性, NN, 経妊 2

回、出産 1 回 (流産の原因不明)。2006 年 10 月に初回妊娠時の不規則抗体スクリーニングで抗 M が検出され、食塩水法でのみ反応することから IgM 型抗 M と考えられた。第一子のお産に際し、新生児溶血性疾患等のエピソードはなかった。その後 2007 年 6 月の検査では、食塩水法とポリエチレングリコール添加間接抗グロブリン試験 (Polyethylene glycol-enhanced indirect antiglobulin test : PEG-IAT) の両方に反応する抗 M を検出し、ジチオスレイトール (Dithiothreitol : DTT) 処理で凝集を認めたため、IgM+IgG 型抗 M と判定した。

2009 年 6 月に 3 回目の妊娠時、2009 年 11 月 27 日 (21w) から出産前日の 2010 年 3 月 24 日 (38w) まで、60min-IAT と PEG-IAT の 2 方法を用いて、O 型 MM 血球 (Ortho Clinical Diagnostics 株式会社) を使用し、2 週間毎の抗 M 抗体価を測定した (Fig. 1)。11 月 27 日 (21w) の抗 M 抗体価は、60min-IAT で 1 倍未満、PEG-IAT で 32 倍であり、その後 60min-IAT では 2010 年 1 月 15 日 (28w) まで 1 倍未満であったが、PEG-IAT での抗体価は徐々に上昇し、3 月 8 日 (36w) の抗体価

1) 佐賀大学医学部附属病院検査部

2) 佐賀大学医学部附属病院輸血部

3) 佐賀大学医学部附属病院血液・腫瘍内科

〔受付日：2013 年 3 月 4 日, 受理日：2013 年 10 月 2 日〕

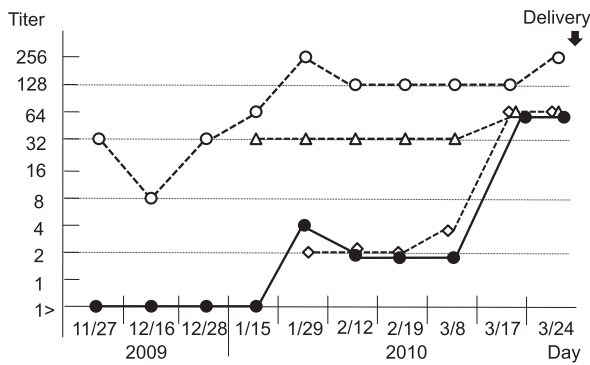


Fig. 1 Clinical course of the titers of anti-M during pregnancy in this patient.

Change in anti-M during mid to late pregnancy periods. Representative data show the titers determined using PEG-IAT (○), saline method (△) and DTT-treated 60-min IAT (◇), 60-min IAT (●), respectively.

PEG-IAT: polyethylene glycol-enhanced indirect antiglobulin test.

60-min IAT: indirect antiglobulin test with no enhancing reagents.

DTT: dithiothreitol.

は60min-IATで2倍、PEG-IATで128倍であった。3月17日(37w)の抗体価測定では60min-IATで1倍、2倍希釈は陰性であったが、4倍希釈から凝集がみられ、64倍希釈まで凝集した。DTT処理後の抗M抗体価を60min-IATで測定したところ64倍であり、このときの食塩水法による抗M抗体価は64倍であった(Table 1)。出産前日の最終抗体価は60min-IATで64倍、PEG-IATで256倍であったため、3月25日(38w)に誘導にて分娩となったが、輸血は実施しなかった。

出生児の出生直後の検査結果は、T-Bil 2.9mg/dl, Hb 15.2g/dl, 血液型はO型RhD陽性, MN, 直接抗グロブリン試験(Direct antiglobulin test: DAT)陰性, 児の赤血球のジクロロメタン・ジクロロプロパン解離液(DT解離液)から抗Mは検出されなかった。臍帯血の血清中にはIgM+IgG型の抗Mが存在し、母親の血液の混入が示唆されたため抗M抗体価は測定していない。また簡易法において、T-Bil値は2生目で10.8mg/dl, 5生目で17.5mg/dlと推移したが、光線療法などの処置を必要とすることなく、出生後5日目に母子ともに軽快退院となった。

追加検査

3月17日(37w)の60min-IATを用いた抗M抗体価は、1倍、2倍希釈で陰性化した。この原因として、赤血球上のM抗原に37°Cでも反応するIgM型抗体が結合することにより、IgG型抗体の結合が抑制され、IAT時に抗IgGグロブリン血清を添加しても、凝集として見えるほど十分量の架橋ができなかった可能性が示唆

された。3月17日(37w)と同様の反応を示した3月24日(38w)の検体を用いて、抗体の結合についてFCMによる解析を行った。

1. 方法及び結果

フローサイトメーターは、FACS Calibur™(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を用いた。

1) IgM型抗Mの反応温度域についての検討

グルタルアルデヒドにより固定後、PBSで3%に調整したO型MM血球10μlに、一次抗体として患者血清20μlを加え、4°C、26°C、37°Cでそれぞれ60分反応後、二次標識抗体としてAnti-Human IgM-FITC(Dako社)を反応させた。その結果、各温度域での幾何学的平均蛍光強度(GMFI: geometric mean fluorescence intensity)は、4°Cで4.22、26°Cで4.84、37°Cで5.44であったことから、患者のIgM型抗Mは低温度域よりも37°Cでよく反応する抗体と判明した(Fig. 2)。

2) IgM型抗MおよびIgG型抗Mの37°C温度域における結合性の検討

グルタルアルデヒドにより固定後、PBSで3%に調整したO型MM血球10μlに、一次抗体として患者血清20μlを加え、37°C60分間反応させ、二次標識抗体にAnti-Human IgM-FITC, Anti-Human IgG-FITC(Dako社)をそれぞれ反応させた。

GMFIはIgM型抗Mで5.44、IgG型抗Mで5.81であり、2つのヒストグラムからも、37°C温度域で同程度反応していることが判明した(Fig. 3)。

3) DTT処理患者血清を用いたIgG型抗Mの37°C温度域における結合性についての検討

グルタルアルデヒドにより固定後、PBSで3%に調整したO型MM血球10μlに、一次抗体としてDTT処理後患者血清20μlと未処理患者血清20μlをそれぞれ37°C60分間反応後、Anti-Human IgG-FITCを反応させ比較した。その結果、DTT処理後患者血清のGMFIは12.01、未処理患者血清のGMFIは7.38であった。DTT処理後患者血清のほうが未処理患者血清に比べ蛍光強度が強いことから、DTT処理をすることでIgG型抗Mの結合量が増加したことが示唆された(Fig. 4)。

考 察

反応増強剤を添加したIATにおいて、臨床的意義のない冷式抗体が持ちこして凝集を認める場合がある³⁾。このような反応を回避し、臨床的意義のある抗体を検出するために、簡易法として60min-IATを実施するようになっている²⁾。また60min-IATにおける凝集反応の有無が、適合血選択の目安になっている。しかし、検出された不規則抗体がIgM型かIgG型かを判別するには、DTTや2-メルカプトエタノール(2-mercaptoethanol: 2-ME)を用いた精査が必要となる⁴⁾。

Table 1 Titers of anti-M determined via various methods at 37 weeks' gestation

Titer	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Saline method	NT	3+	3+	3+	2+	2+	1+	±	0	0
PEG-IAT	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	±	0
60-min IAT	0	0	±	1+	1+	1+	1+	±	0	0
DTT-treated + 60-min IAT	NT	1+	1+	1+	1+	1+	1+	±	0	0

PEG-IAT: polyethylene glycol-enhanced indirect antiglobulin test

60-min IAT: indirect antiglobulin test with no enhancing reagents

DTT: dithiothreitol

NT: not tested

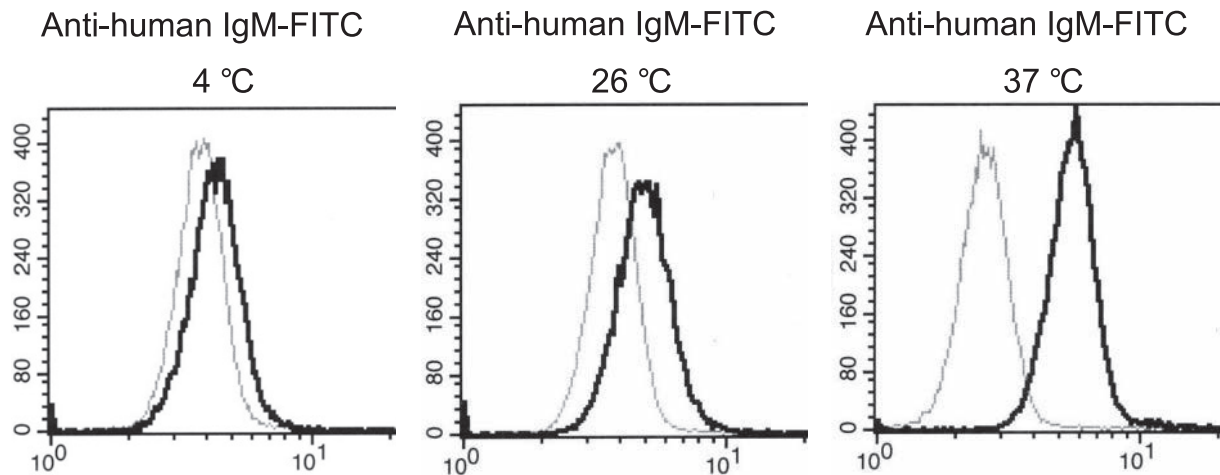


Fig. 2 RBC-bound IgM type anti-M determined using FCM.

Cell surface IgM type anti-M on RBC were detected via FCM using anti-human IgM antibody conjugated with FITC. Binding pattern of IgM type anti-M with RBC surface was analyzed after incubation for 60 min. at different temperatures (4°C, 26°C or 37°C).

X axis: fluorescence intensity on a logarithmic scale

Y axis: number of cells

—: Negative control

今回経験した抗 M は、妊娠を契機に IgM 型から IgM 型と IgG 型が混在するようになった。通常、抗 M は 37°C で反応しない冷式抗体の場合が多いが⁸⁵⁾、IgG 型抗 M による重度の新生児溶血性疾患 (hemolytic disease of the newborn: HDN)⁶⁷⁾ や胎児水腫の発症が報告されている⁸⁹⁾。また赤血球製剤の輸血には、M 抗原陰性血液を選択する必要があり、臨床的意義の有無を判別することは極めて重要である。本症例では、患者の血液型は MN で、臍帯血の血清中に IgM 型と IgG 型の抗 M が検出された。通常、胎盤通過性がないとされる IgM 型抗 M が検出されたことは、何らかの原因で母親の血液が臍帯血に混入した可能性が高い。また実際の移行抗体の抗体価は不明であるが、臍帯血の DT 解離液から抗 M は検出されなかった。T-Bil 値の上昇も生理的変動内で、光線療法等の処置なく退院している。また母児ともに輸血は必要なかったが、母親の検体で不規則抗体スクリーニング及び M 抗原陽性の赤血球製剤との交差適合試験を、60min-IAT で実施した場合、陰性と

なっていた可能性が高い。なぜなら、妊娠 37 週から 38 週の抗 M 抗体価は DTT 処理後血清での 60min-IAT では 64 倍であるが、未処理血清の抗 M 抗体価測定を 60min-IAT で実施したところ、1 倍と 2 倍希釈血清では陰性となった。このような症例では不規則抗体スクリーニングを 60min-IAT で実施した場合、IgG 型抗体の存在を見逃す恐れがあり、DTT や 2-ME による処理を行わなければ、臨床的意義のある抗体かどうか判別は困難である。

未処理血清で陰性化した原因を検索するため、FCM にて解析を行った。母親が保有している IgM 型抗 M は、低温域より 37°C で反応性が強くなる傾向を示した。さらに IgG 型抗 M において、DTT 処理後血清と未処理血清との蛍光強度を比較すると、DTT 処理後血清の方が、蛍光強度が強くなったことから、IgM 型抗体を破壊することで IgG 型抗体の結合量が増加することが確認できた。これらのことから、37°C 加温時間が長い 60min-IAT では、37°C 反応性 IgM 型抗 M が赤血

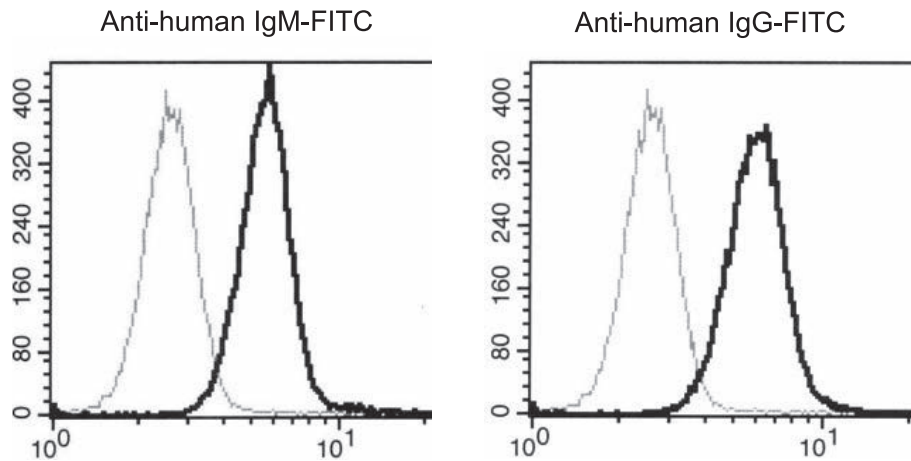


Fig. 3 RBC-bound IgM and IgG type anti-M at 37°C. Cell surface IgM and IgG type anti-M on RBC were detected via FCM using anti-human IgM or IgG antibodies conjugated with FITC incubated at 37°C for 60 min.

X axis: fluorescence intensity on a logarithmic scale
 Y axis: number of cells
 —: Negative control

Anti-human IgG-FITC
 37 °C for 60 min.

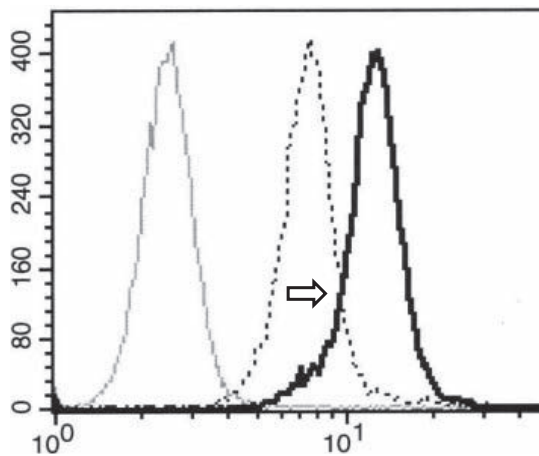


Fig. 4 Increase in cell surface IgG type anti-M after DTT treatment. After 60-min treatment with DTT at 37°C, fluorescence intensity due to RBC-bound anti-human IgG antibodies was increased.

—: No serum
 ---: Non-processing serum
 - - - : DTT (dithiothreitol) treatment
 X axis: fluorescence intensity on a logarithmic scale
 Y axis: number of cells

球上の M 抗原と多く反応し、IgG 型抗 M の結合を一部抑制したと推測された。そのため IAT 時の抗 IgG グロブリン血清と十分量架橋できず、反応が陰性化したと思われる。また、37°C 反応性 IgM 型抗 M が赤血球上の M 抗原と反応しているにも関わらず凝集反応が認められなかった。その明確な理由は不明であるが、凝集

を示すには至らない程度の量であった可能性が考えられる。

抗 M には pH 依存性のものが知られており、被検血清を酸性化すると凝集反応が増強するといわれている¹⁰⁾。また pH 依存性の抗 M が、高希釈倍率になるほど溶液の pH が下がり、低希釈倍率で陰性化したという報告もある¹¹⁾。今回の症例が pH 依存性の抗 M であるかは不明であるが、未処理血清、DTT 処理後血清に関わらず、連続 2 倍希釈系列作成時の溶液の pH は、保存液で作成されている市販の血球浮遊液を添加した段階では pH の低下を認めず、一定の pH を維持していた。このことから、未処理血清の低希釈倍率で陰性化した原因が、溶液の pH によるものとは考えにくいと思われる。しかしながら本症例では検体量不足のため、抗 M の pH 依存性についての検証は行えておらず、pH 依存性の反応抑制は完全には否定できていない。

通常、冷式抗体の持ちこしによる反応かどうか識別するため、60min-IAT を用いることが推奨されている。しかし、今回の症例のように IgG 型抗体の結合抑制が考えられる場合は、臨床的意義のある抗体を見逃す可能性がある。DTT や 2-ME 処理により IgM 型抗体を破壊することで、臨床的意義のある抗体を検出する重要性が示唆された。

結 語

今回、IgG + IgM 型抗 M 保有の妊婦血清を用いて、免疫グロブリンクラス別反応性を検討した。妊娠末期には、IgG 型抗 M 抗体価が 64 倍まで上昇したにもかかわらず希釈系列の 1 倍、2 倍希釈血清での 60min-IAT

は陰性であった。この時期に 60min-IAT のみで不規則抗体スクリーニングを実施した場合、IgG 型の抗 M が陰性化し見逃す可能性があると思われた。60min-IAT が陰性であっても臨床的意義のある IgG 型抗体を保有する場合があります、反応増強剤を用いた IAT で反応する IgM 型冷式抗体が存在する場合は、DTT や 2-ME 処理により、IgG 型抗体の有無を確認することが重要と思われた。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) 遠山 博：輸血学，第 3 版，中外医学社，東京，2004，416.
- 2) 輸血医学教育委員会検査技師教育推進小委員会編：輸血のための検査マニュアル Ver.1.2，2011，9—11.
- 3) 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。日本輸血学会雑誌，49：640—645，2003.
- 4) 安田広康：不規則抗体鑑別のポイントと抗体同定検査の進め方。Medical Technology，39：1405—1411，2011.
- 5) Reid M E., Lomas-Francis C: BLOOD GROUP ANTIGENS & ANTIBODIES, SBB Books, New York, 2007, 95.
- 6) 上村正巳，富樫和枝，大木直江，他：低力価抗 M の関与が考えられた重篤な HDFN の 1 症例。日本輸血細胞治療学会誌，57：343，2011.
- 7) 安田広康，大戸 齊：MN 血液型不適合妊娠による新生児溶血性疾患：日本人症例の再調査でわかった出生後の遅発性貧血。日本輸血細胞治療学会誌，57：343，2011.
- 8) 大戸 齊，遠山 博：小児輸血学，初版，中外医学社，東京，2006，98—99.
- 9) 石丸 健，大橋 恒，佐藤進一郎，他：抗 M を保有する妊婦より出生した胎児水腫の 1 症例。日本輸血細胞治療学会誌，57：246，2011.
- 10) 中野 篤：交差適合試験及び不規則性抗体検査にて検出された「pH 依存性抗 M 抗体」の反応性について。日本輸血細胞治療学会誌，54：200，2008.
- 11) 館岡樹里，石丸 健，大橋 恒，他：妊婦が保有する間接抗グロブリン法陰性の pH 依存性抗 M について。日本輸血細胞治療学会誌，56：733，2010.

PRESENTATION OF PARTIALLY NEGATIVE INDIRECT ANTIGLOBULIN TEST WITHOUT ENHANCING REAGENTS IN A PREGNANT WOMAN CARRYING ANTI-IgM PLUS ANTI-IgG TYPE ANTI-M

Marie Yamada¹⁾, Naotomo Yamada¹⁾, Yasushi Kubota²⁾³⁾, Shinya Kimura³⁾,
Takanori Higashitani¹⁾ and Eisaburo Sueoka¹⁾²⁾

¹⁾Department of Laboratory Medicine, Saga University Hospital

²⁾Department of Transfusion Medicine, Saga University Hospital

³⁾Division of Hematology and Oncology, Department of Internal Medicine, Saga University Hospital

Abstract:

The indirect antiglobulin test (IAT) often registers as a false positive with enhancing reagents in screening test for irregular antibodies and cross-match test in response to the presence of cold antibodies. Since cold antibodies do not cause a transfusion reaction, IAT without enhancing reagents, 60-min IAT is useful in distinguishing clinically significant antibodies. We recently experienced a rare case in which 1× and 2× -diluted samples showed negative results, while 4× -diluted samples showed positive results on 60-min IAT. IgM type anti-M was produced at a patient's first pregnancy, and IgM + IgG type anti-M was produced after the first child delivery. At the third pregnancy, anti-M titer was monitored every two weeks until the day before delivery. Titer of anti-M increased to 1:64, but findings for 1:1-2 dilution serum of the patient were negative on 60-min IAT at 37 weeks into the pregnancy. Flow cytometry analysis revealed that IgM type anti-M reacted more strongly at 37°C than at lower temperatures. These findings suggested that anti-IgG globulin serum was unable to be used to build bridges, resulting in the negative results on IAT because IgM type anti-M, which reacted at 37°C, inhibited the binding of IgG type anti-M. The present case has shown the importance of using dithiothreitol or 2-mercaptoethanol, which destroys IgM type antibody, for the detection of clinically significant antibodies.

Keywords:

Indirect antiglobulin test, Anti-M, Hemolytic disease of the newborn, Pregnancy, Flow cytometry