

強い自己凝集を認めた低力価寒冷凝集素症に対する DTT 処理の有用性

細川 美香¹⁾ 中山小太郎純友¹⁾ 櫻木美基子¹⁾ 中尾まゆみ¹⁾ 森川 珠世¹⁾
清川 知子¹⁾ 青地 寛¹⁾ 永峰 啓丞¹⁾ 加藤 恒²⁾ 富山 佳昭¹⁾

低力価寒冷凝集素症 (Low titer cold agglutinin disease : Low titer CAD) は、低力価の寒冷凝集素が 22% アルブミンを用いた測定法により著明に上昇し、30℃ 以上でも活性を示す特徴を有する。本論文では 37℃ 条件下でも強い自己凝集を認めた Low titer CAD の症例を経験し、その解析法を検討した。寒冷凝集素が引き起こす赤血球の自己凝集は、ABO 血液型オモチ検査や RhD 血液型検査を実施する上で障害となった。対処法として 37℃ あるいはそれ以上の加温条件下での検体管理や、温生食による血球洗浄を試みたが、自己凝集が強く自己凝集の抑制は困難であった。そこで我々は 0.01M Dithiothreitol (DTT) を用いて IgM 型抗体のジスルフィド (S-S) 結合を還元的に切断し、自己凝集を抑制し、A 型 RhD 陽性と判定した。Flow cytometry での解析にて患者赤血球上の IgM 型抗体が不活化されたことを確認した。また、輸血の際には同種抗体の有無も重要となるが、寒冷凝集素の作用温度域が広いため同種抗体の有無を判定出来なかった。そこで、患者血漿を DTT 処理し IgG 型の同種抗体は存在しないことを確認した。以上より、強い自己凝集を誘導する寒冷凝集素への対処法として DTT 試薬は操作が簡便であり、管理しやすく有用であると思われた。

キーワード：自己凝集，DTT 処理，低力価寒冷凝集素症

はじめに

寒冷凝集素は健常者血清中にも低濃度ながら存在するが、体温条件では活性を示さず無害性である。臨床症状の発現には、その力価よりも作用温度域や補体活性化能が重要であり^{1)~3)}、凝集素価と溶血所見とは相関が乏しい。凝集素価が低力価であっても体温で活性を示す反応温度域の広い異常な凝集素であれば強い溶血症状を起こす。このような病型を低力価寒冷凝集素症 (Low titer cold agglutinin disease : Low titer CAD) と呼び¹⁾⁴⁾、低力価の凝集素が 22% アルブミンを用いた寒冷凝集素価測定法 (以下、アルブミン法) により著明に上昇し、30℃ 以上でも活性を示す特徴を有する¹⁾⁵⁾。今回、我々は 37℃ 条件下でも強い自己凝集を認めた Low titer CAD の症例を経験した。この症例は一般的な自己凝集の対処法である 37℃ 条件下での検体管理や検査法⁶⁾ では対処出来ず、43~45℃ 条件下での検体管理でも対処出来なかった。そこで、IgM 型の抗体を不活化させるため Dithiothreitol (DTT) 処理を実施した。DTT 処理は極めて有用で、DTT 処理を施すことで判定不能であった検査結果を判定することが可能となり、IgG 型同種抗体の存在の有無も確認できた。

症例および方法

1. 症例

患者：64 歳，女性。
既往歴：特記すべきことなし。
妊娠歴：2 回。
輸血歴/移植歴：無し。

経過：気管支喘息にて近医通院加療中、20XX 年 4 月頃より咳嗽増加、両下肢のしびれ、筋肉痛、好酸球の増多を認め、同年 5 月精査目的で当院紹介となった。

初診時の検査所見 (表 1)：末梢血液検査では赤血球数 $123 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb8.9g/dl、MCV119.5fl と検査結果に乖離がみられ、採血管内では明らかな赤血球の凝集が認められた。生化学検査では間接ビリルビン 0.6mg/dl、LDH537U/l と明らかな溶血所見は認めなかったが、ハプトグロビンは 2mg/dl 未満と著明に低下していた。そこで自己凝集精査と貧血が進んだ場合の輸血に対応するため輸血関連検査が依頼された。

2. 患者検体の採取

患者検体は自己凝集を認めていたため、37℃ に加温した採血管を用いて患者血液を採取し、直ちに遠心分離後、温生理食塩液 (37℃)、温めた試薬を用いて直接

1) 大阪大学医学部附属病院輸血部

2) 大阪大学大学院医学系研究科血液腫瘍内科

〔受付日：2017 年 3 月 22 日，受理日：2017 年 6 月 7 日〕

表1 初診時の検査所見

末梢血			
WBC	18,300 / μ l	T.Bil	0.8 mg/dl
Seg	14 %	D.Bil	0.2 mg/dl
Eo	71 %	LBil	0.6 mg/dl
Ba	0 %	CRP	0.08 mg/dl
St	0 %	TP	7.4 g/dl
Lym	13 %	Alb	3.6 g/dl
Mo	2 %	IgG	2,023 mg/dl
RBC	123×10^4 / μ l	IgA	230 mg/dl
Hb	8.9 g/dl	IgM	72 mg/dl
Ht	14.70 %	IgE	1,141.2 IU/ml
MCV	119.5 fl	BUN	14 mg/dl
MCH	72.4 pg	UA	5.5 mg/dl
MCHC	60.50 %	Cr	0.73 mg/dl
Plt	37.2×10^4 / μ l	Na	140 meq/l
Reticulocytes	4.60 %	K	4.3 meq/l
生化学		Cl	107 meq/l
GOT	25 U/l	RF	199 IU/ml
GPT	20 U/l	Fe	67 μ l/dl
γ GTP	25 U/l	Feritin	271 ng/ml
ALP	268 U/l	Vit-B12	756 pg/ml
LDH	447 U/l		
LAP	66 U/l		
ChE	258 U/l		
CPK	269 U/l		
Amylase	75 U/l		

抗グロブリン試験 (direct antiglobulin test : DAT) などを実施したが自己凝集は消失しなかった。そのため、次の採血では 43~45°C に加温した採血管を用いて患者血液を採取し、遠心分離中に温度が下がることを防ぐため 43~45°C に加温しておいた試験管に分注後、900~1,000G、1分で遠心分離を行い、上清を別の加温しておいた試験管に分注した。さらに同様の操作を2回繰り返し遠心分離を行った。分離後の血清、血漿は別試験管に分注した。赤血球は温生理食塩液 (40°C 付近) で3回洗浄後、3% 患者赤血球浮遊液を作製した。

3. 検体処理

1) DTT 処理

患者赤血球、血漿、酸解離液は IgM 型の抗体を不活化させるため DTT 処理を行った⁷⁾。

DTT 粉末(和光純薬)はリン酸緩衝生理食塩液 (PBS, pH7.0) で 0.1M に調製し、小分け分注後 -40°C で凍結保存し、使用時に PBS で 10 倍希釈し 0.01M DTT/PBS を調製した。

赤血球の DTT 処理は、洗浄患者赤血球を PBS で 50% に調製後、50% 患者赤血球浮遊液に等量の 0.01M DTT/PBS を添加し、37°C で 10~15 分加温後、3 回洗浄し生理食塩液に再浮遊させる手順で行った。

血漿と酸解離液の DTT 処理は、患者血漿あるいは酸解離液に等量の 0.01M DTT/PBS を加え、37°C で 30~60 分加温する手順で行った。

4. 輸血関連検査

1) 血液型検査

ABO 血液型検査, RhD 血液型検査は試験管法で実施した⁸⁾。赤血球は 43~45°C 条件下で採血した未処理患者赤血球と DTT 処理患者赤血球、血漿は 43~45°C 条件下で採血した未処理患者血漿を用いた。試薬は全て 37°C に加温したものを用いた。

2) 不規則抗体検査

不規則抗体スクリーニング検査はスクリーニング血球 (スクリーンサイト Di[®], カイノス) を用いて、生理食塩液法 (直後判定および 5 分後判定) と PEG 間接抗グロブリン試験 (PEG-indirect antiglobulin test : PEG-IAT), また、追加検査として重合ウシアルブミン-IAT (ALB-IAT) を試験管法で実施し、酵素 2 段法はマイクロタイピングシステム (バイオ・ラッド) を用いたパライン 2 段法で実施した⁸⁾。検体は 43~45°C 条件下で採血した未処理患者血漿, DTT 処理患者血漿を用いて実施した。

また、DTT 処理患者血漿は 2 倍希釈となるため、対照として生理食塩液を用いて 2 倍希釈した患者血漿も同様に検査した。

3) 直接抗グロブリン試験 (direct antiglobulin test : DAT)

37°C, あるいは 43~45°C 条件下で採血した血液の血球沈渣を用いて 3% 患者洗浄赤血球浮遊液を作製し、各試験管に 1 滴ずつ加え、3 回洗浄後、それぞれの試験管に多特異抗ヒトグロブリン試薬 (ダイアクロンタームス (グリーン), バイオ・ラッド), 抗 IgG 試薬 (抗ヒト IgG 血清, オーツ), 抗補体試薬として抗 C3b, C3d (バイオクロン抗 C3b, C3d, オーツ), 抗 C3d (バイオクロン抗 C3d, オーツ), 陰性コントロールとして生理食塩液を各 2 滴ずつ滴下し、遠心後判定した。試薬は全て 37°C に加温したものを用いた。また、37°C 条件下で採血した血球沈渣は DTT 処理後も同様に実施した。

4) 抗体解離試験

酸解離試薬 (グリシン酸解離システム : イムコア) を用いて患者洗浄赤血球から抗体を解離し、不規則抗体スクリーニング検査を実施した。

5) Flow cytometry (FCM) を用いた血球表面結合抗体の解析

未処理患者赤血球と DTT 処理患者赤血球を 3 回洗浄後、3% 洗浄患者赤血球浮遊液を作製し、FITC-抗ヒト IgG (Goat F (ab')₂ anti-human IgG fluorescein conjugate : Bio source) と FITC-抗ヒト IgM (Goat F (ab')₂ anti-human IgM FITC conjugate : Bio source) にそれぞれ反応させ、フィルターを通し凝集を除いた後、FCM を用いて測定し、抗ヒト IgG と抗ヒト IgM の平均蛍光

表 2-I ABO・RhD 血液型検査結果

	ABO 血液型検査							RhD 血液型検査			
	オモテ検査			ウラ検査				総合判定	抗 D	Rh control	判定
	抗 A	抗 B	判定	A ₁ cell	Bcell	判定					
未処理患者検体* ¹	4+	w+	保留	0	2+	A	保留	4+	w+	保留	
DTT 処理患者赤血球	4+	0	A				A	4+	0	陽性	

*¹43～45℃ 条件下で採血した患者検体

表 2-II 不規則抗体検査結果

	未処理血漿 (37℃ 条件下で採血した患者検体)					DTT 処理血漿				
	生食法 (RT, 直後)	生食法 (RT, 5分)	ALB-IAT	PEG-IAT	酵素法	生食法 (RT, 直後)	生食法 (RT, 5分)	ALB-IAT	PEG-IAT	酵素法
I	0	1+	4+	1+	4+	0	0	0	0	0
II	0	1+	4+	1+	4+	0	0	0	0	0
Di ^a cell	0	1+	4+	1+	4+	0	0	0	0	0
Oi cell	0	w+	4+	1+	4+	0	0	0	0	0
未処理患者赤血球	2+	2+	4+	3+	N.T	2+	2+	2+	2+	N.T
DTT 処理患者赤血球	N.T	N.T	N.T	N.T	N.T	0	0	0	0	N.T

生食法：生理食塩液法, RT：室温

Alb-IAT：アルブミン間接抗グロブリン試験, PEG-IAT：PEG 間接抗グロブリン試験

I, II, Di^a cell：スクリーニング血球

N.T：Not tested

強度 (mean fluorescence intensity：MFI) を解析した。コントロールとして DAT 陰性の正常人血球を用いた。

6) 寒冷凝集素温度作動域の測定

生理食塩液で 2 倍連続希釈した患者血清 2 滴と 5% O 型赤血球 1 滴を混和し, 37℃ で 30～60 分静置後, 遠心し凝集を観察した。凝集の認められた最高希釈倍率を 37℃ での寒冷凝集素価とした。その後, 室温 (20～25℃), 4℃ でも同様に寒冷凝集素価を測定した。

7) アルブミン法による寒冷凝集素温度作動域の測定

22% アルブミン液を用いて患者血清の 2 倍連続希釈を行い, 寒冷凝集素温度作動域測定法 (生理食塩液法) と同様の方法を用いて実施した¹⁾。

結 果

1) 血液型検査 (表 2-I)

i) 未処理検体

43～45℃ 条件下で採血した未処理患者赤血球では ABO 血液型オモテ検査は抗 B に対する反応が w+ となり判定保留となった。RhD 血液型検査では Rh control が陽性となり判定保留となった。

ii) DTT 処理検体

DTT 処理患者赤血球が DAT 陰性になったことを確認し (“直接抗グロブリン試験”の項に後述), 再度 ABO 血液型オモテ検査と RhD 血液型検査を実施するとオモテ・ウラ検査一致, Rh control 陰性で A 型 RhD 陽性と確定出来た。

2) 不規則抗体検査 (表 2-II)

i) 未処理血漿

スクリーニング血球 (1, 2, 3) との反応は, 生理食塩液法の即判定で全て陰性, 室温 5 分後判定では 1+, PEG-IAT では 1+, ALB-IAT では 4+, 酵素 2 段法では 4+ であり, 全ての血球で反応強度は同程度であり抗原特異性は認められなかった。未処理患者赤血球との反応は生理食塩液法 (即判定, 室温 5 分後) では 2+, PEG-IAT では 3+, ALB-IAT では 4+ であった。さらに, Ii 特異性を検討したが, OI 血球と Oi 血球では反応強度にほぼ差を認めず特異性は認められなかった。

ii) DTT 処理血漿

スクリーニング血球 (1, 2, 3) との反応は全ての方法で陰性となった。未処理患者赤血球との反応は酵素法を除く全ての方法で 2+ となり, DTT 処理患者赤血球との反応は酵素法を除く全ての方法で陰性となった。

DTT 処理にて患者血漿は 2 倍希釈されるため, 生理食塩液で 2 倍希釈した患者血漿を用いた不規則抗体検査を施行したが, 未処理患者血漿とほぼ同様の結果であり, DTT 処理患者血漿が希釈されたことで陰性になったのではないことが確認された。

3) 直接抗グロブリン試験 (表 3-I)

i) 未処理赤血球

37℃ 条件下で採血をした未処理患者赤血球を用いた検査では陰性コントロールが陽性となり判定保留となった。一方, 43～45℃ 条件下で採血をした未処理患者赤血球を用いた検査では, 抗 C3b, C3d と抗 C3d のみ w+

表 3-I 直接抗グロブリン試験結果

	多特異	抗IgG	抗 C3b, C3d	抗 C3d	Control
37℃ 条件下で採血した患者赤血球	2+	1+	2+	1+	1+
40～43℃ 条件下で採血した患者赤血球	0	0	w+	w+	0
DTT 処理患者赤血球	0	0	N.T	N.T	0

N.T : Not Tested

表 3-II 抗体解離試験結果

	抗体解離液			DTT 処理後解離液		
	生食法 (RT, 直後)	ALB- IAT	PEG- IAT	生食法 (RT, 直後)	ALB- IAT	PEG- IAT
1	0	1+	3+	0	0	0
2	0	1+	3+	0	0	0
3	0	1+	3+	0	0	0

生食法：生理食塩液法, RT：室温

ALB-IAT：アルブミン間接抗グロブリン試験, PEG-IAT：PEG 間接抗グロブリン試験

1, 2, 3：スクリーニング血球

となり、その他は陰性コントロールを含め全て陰性となった。

ii) DTT 処理赤血球

陰性コントロールを含め多特異、抗 IgG 血清は全て陰性となり、ABO 血液型オモテ検査や RhD 血液型検査に DTT 処理血球を用いることが出来ると判断した。

4) 抗体解離試験 (表 3-II)

i) 未処理抗体解離液

患者血球から得られた抗体解離液で不規則抗体検査と同様の検査を実施したところ、生理食塩液法の室温 5 分後判定では陰性、37℃ 15 分後判定では 1+, PEG-IAT では 3+, ALB-IAT では 1+ であり、全ての血球で反応強度は同程度であった。

ii) DTT 処理抗体解離液

不規則抗体検査と同様の検査を実施したところ、全ての方法で陰性となった。

5) FCM を用いた血球表面に結合している抗体の解析 (図 1)

37℃ 条件下で採血した血球表面に結合していた抗 IgM の MFI の平均はコントロール：9.71, 未処理患者赤血球：35.67, DTT 処理患者赤血球：8.99 であった。未処理患者血球のみ蛍光強度の山が右にシフトしており IgM 型の抗体が検出された。一方、DTT 処理患者赤血球の蛍光強度はコントロールとほぼ同等であり、IgM 型の抗体は失活したことが示された。また、抗 IgG の MFI の平均はコントロール：10.72, 未処理患者赤血球：9.71 であり、IgG 型の抗体は検出されなかった。

6) 寒冷凝集素温度作動域の測定結果 (表 4)

生理食塩液法での寒冷凝集素価は 37℃ で 1 倍、室温で 2 倍、4℃ で 1 倍であったが、アルブミン法による寒冷凝集素価は 37℃ で 256 倍、室温で 1,024 倍、4℃ で

128 倍とアルブミン法で著明に上昇した。

考 案

本症例は自己凝集が強く、ハプトグロビンも 2mg/dl 未満に低下しており、不規則抗体検査では ALB-IAT と PEG-IAT で特異性を示さず患者赤血球 (自己対照) を含め全ての血球で凝集し、酸解離液においても PEG-IAT で特異性を示さず凝集が強かったことから自己免疫性溶血性貧血 (Autoimmune hemolytic anemia : AIHA) を考えた。AIHA は自己抗体の至適反応温度によって、温式と冷式に分類されるが、その大多数が体温付近で最大活性を示す IgG 型の抗体による温式 AIHA である。一方、体温以下の低温で反応し、通常 4℃ で最大活性を示す冷式抗体による AIHA があり、IgM 寒冷凝集素による CAD と発作性寒冷血色素尿症 (Paroxysmal cold hemoglobinuria : PCH) が存在する¹⁹⁾。

ときに温式抗体と冷式抗体の両者が検出されることがあり、混合型 AIHA と呼ばれる。混合型 AIHA の診断基準は明確になっていないが、赤血球に IgG と C3d の両方が検出され、血清中の寒冷凝集素は 37℃ でも活性を示す広域性で、血清中の IgG 抗体は温式であるもの、との報告がある¹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。我々の症例も自己凝集が強いことから IgM 型抗体が存在し、その IgM 型抗体は至適温度が 37 度域まで広がっていると考えた。また、37℃ 温度域で活性を示す IgG 型の抗体の存在も疑い混合型 AIHA を考えた。しかし、患者血漿や酸解離液を DTT 処理することで全ての検査法での反応が陰性化し、DAT では補体のみが陽性となった。また、FCM を用いて患者血球表面に結合している免疫グロブリンクラスを調べると IgM 型の抗体のみが結合していた。以上の結果より、患者血漿中の抗体や患者血球に結合していた抗

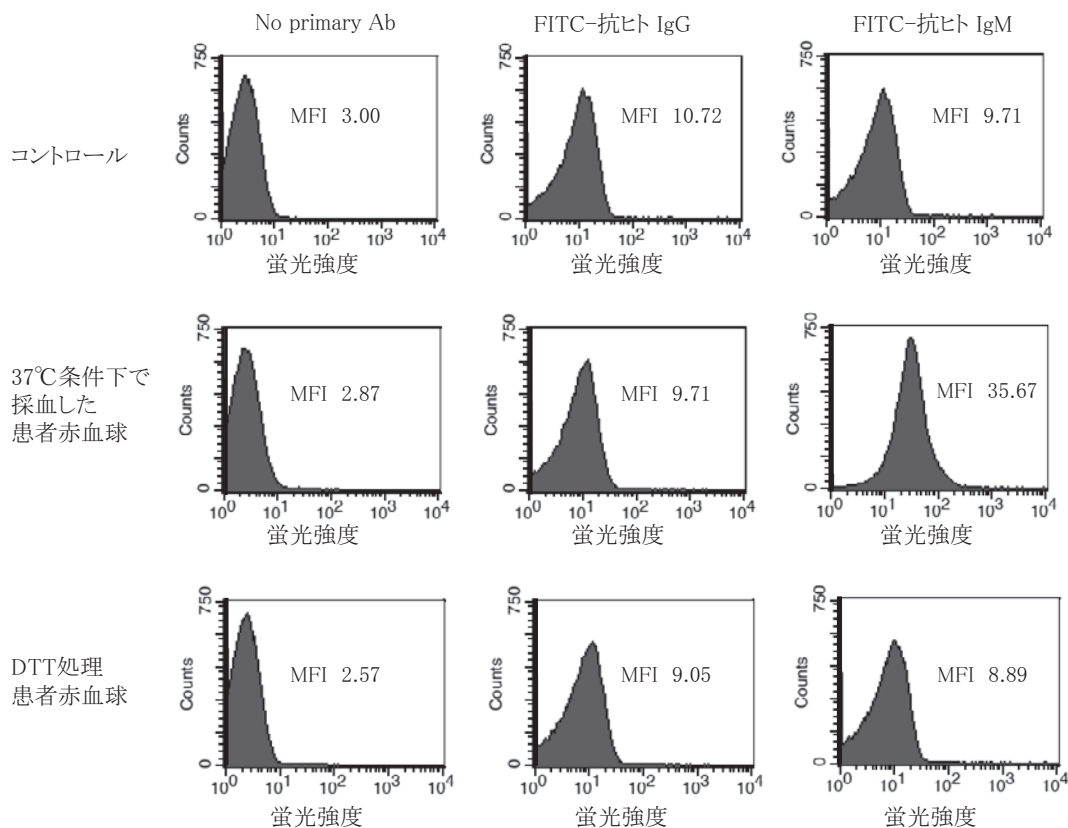


図1 FCMを用いた血球表面に結合している抗体の解析

未処理患者赤血球と DTT 処理患者赤血球を 3 回洗浄後、3% 洗浄患者赤血球浮遊液を作製し、FITC-抗ヒト IgG と FITC-抗ヒト IgM にそれぞれ反応させ、フィルターを通し凝集を除いた後、FCM を用いて測定し、抗ヒト IgG と抗ヒト IgM の MFI を解析した。

MFI : Mean fluorescence intensity

表4 寒冷凝集素温度作動域の測定結果

	37°C	RT	4°C
生理食塩液法	1 倍	2 倍	1 倍
アルブミン法	256 倍	1,024 倍	128 倍

RT : 室温

体は反応温度域の広がった IgM 型の抗体であると判断し、混合型 AIHA は否定的であると考えた。

寒冷凝集素はそのほとんどが IgM 型の抗体である。IgM 型の抗体は低温条件でも C1q を結合し、再加温で IgM 型の抗体は赤血球から遊離する。しかし古典経路による補体の活性化は続き、C4b や C3b、C3d は赤血球から遊離しないため、DAT では補体成分のみ陽性となることが多く、我々の症例もこの結果と一致していた。

また、寒冷凝集素は凝集素価が 1,000 倍以上、または 1,000 倍未満でも 30°C 以上で活性がある場合には病的意義があるとされている¹⁾。寒冷凝集素価の上昇が軽度である場合や、正常範囲内の場合でも、22% アルブミン液を用いて血清(血漿)の希釈を行い寒冷凝集素価の測定を行うアルブミン法において、生理食塩液法より

アルブミン法の方が凝集素価が上昇する場合、または 30°C 以上での凝集が認められる場合は Low titer CAD と分類されている¹⁾⁵⁾。今回の我々の症例も、生理食塩液法では寒冷凝集素価が低値であったが、アルブミン法では全ての温度域で生理食塩液法よりも明らかに高い値を示し、温度作動域も 37°C 付近まで広がっていたことから、今回の症例は Low titer CAD であると考えられた。一方、Low titer CAD との鑑別が非常に難しいが、極めてまれに IgM 型の温式自己抗体も報告されており、関与する抗体が IgM 型の抗体で寒冷凝集素価が低値の場合は考慮する必要がある¹³⁾¹⁴⁾。

Low titer CAD が溶血を起こす機序については以下のように考えられている。CAD に関与する寒冷凝集素は症例によって赤血球と結合する至適温度に差異があり、その作用温度の広いものでは体温より少し低い温度においても赤血球に結合しうる。また、抗原特異性をもたない場合はより多くの赤血球に結合する。したがって作用温度域が広く、抗原特異性のない寒冷凝集素が産生されれば、低力価であっても強い溶血を生じると考えられる。言い換えると、CAD の発症には単に凝集素価の上昇のみならず、その作用温度域の拡大という

質的な異常が重要な意義をもつと考えられる⁴⁾¹⁵⁾。

CADの治療は保温がもっとも基本的とされ、輸血の際の温度管理も重要である¹⁾。CADに対する副腎皮質ステロイド薬の有効性は温式 AIHA に比べ、はるかに劣るとされるが、Low titer CAD ではステロイド薬が温式 AIHA に劣らぬほど有効であると報告されている³⁾⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。本症例ではハプトグロビンが著明に減少したが、その他の溶血所見で目立ったものはなく貧血も進まなかったためステロイド薬を含め治療せず経過観察とされた。

IgM 型の冷式自己抗体である寒冷凝集素が引き起こす試験管内での赤血球の自己凝集は、輸血を行う際に重要となる ABO 血液型オモテ検査、RhD 血液型検査を実施する上で障害となる。対処法として、37℃ 条件下で検体を管理することや、温生食による血球洗浄が用いられるが⁶⁾、自己凝集が強い場合にはこの対処法だけでは血球表面への IgM 型の抗体の感作を防ぐことが難しく自己凝集を起こしてしまうことがある。今回、提示した Low titer CAD でも自己凝集が強く、上記のような対処法では自己凝集を抑制することが出来ず、43~45℃ 条件下での検体管理でも抑制することが出来なかった。

そこで、我々は操作が簡便であり、比較的安価で保存期間も長く管理しやすい DTT 試薬を用いて、IgM 型抗体のジスルフィド (S-S) 結合を還元的に切断することで不活化させ、自己凝集を抑制させることを試みた。DTT 処理患者赤血球は DAT 陰性となり、IgM 型抗体を不活化することで自己凝集を抑制出来たと考え、ABO 血液型オモテ検査や RhD 血液型検査に DTT 処理血球を用いることが出来ると判断した。また、FCM を用いて赤血球表面の抗体を解析したところ、DTT 処理にて IgM 型抗体が不活化されることが確認された。

一方、輸血を行う際には同種抗体の存在の有無も重要となるが、IgM 型の寒冷凝集素の作用温度域が広がっていたことで同種抗体の有無が不明であった。そこで2倍希釈検体にはなるが、患者血漿を DTT 処理することで不規則抗体検査は全て陰性となり、IgG 型の同種抗体は存在しない可能性が示された。以上より寒冷凝集に対し DTT 処理は極めて有用であると考えられた。

結 語

自己凝集の強い Low titer CAD の症例で輸血検査に苦慮したが、患者赤血球に結合した IgM 型の寒冷凝集素を DTT 処理することで血液型検査の判定が可能となった。また患者血漿を DTT 処理することで同種抗体の存在を否定出来た。輸血検査に影響を及ぼす寒冷凝集素への対処は重要である。DTT 試薬は取り扱いが容易であり、安価で管理しやすいことから、本症例の様な自

己凝集の強い症例に有用であると思われた。

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) 金倉 謙, 亀崎豊実, 梶井英治, 他：自己免疫性溶血性貧血診療の参照ガイド (平成 26 年度改訂版) zoketsu shogaihan.com/file/guideline_H26/AIHA.pdf (2017 年 2 月現在)。
- 2) Rosse WF, Adams JP: The variability of hemolysis in the cold agglutinin syndrome. *Blood*, 56: 409—416, 1980.
- 3) Oshima M, Maeda H, Morimoto K, et al: Low-Titer Cold Agglutinin Disease with Systemic Sclerosis. *Internal Medicine*, 43: 139—142, 2004.
- 4) Schreiber AD, Herskovitz BS, Goldwein M: Low-Tier Cold-Hemagglutinin Disease: Mechanism of Hemolysis and Response to Corticosteroids. *N Engl J Med*, 296: 1490—1494, 1997.
- 5) Petz LD: Cold antibody autoimmune hemolytic anemias. *Blood Rev*, 22: 1—15, 2008.
- 6) 日本臨床衛生検査技師会：直接抗グロブリン試験、輸血・移植検査技術教本, 丸善出版, 東京, 2016, 178—184.
- 7) AABB : Technical Manual, 18th Edition, 437—439, Method 2—18, 3—16.
- 8) 日本臨床衛生検査技師会編集部：第 3 章 輸血前検査, 新輸血の実際, 初版, 日本臨床衛生検査技師会, 東京, 2009, 22—60.
- 9) 小峰光博：後天性溶血性貧血-2) 免疫性溶血性貧血, 浅野茂隆, 池田康夫, 内山 卓監修. 三輪血疫病学, 文光堂, 東京, 1181—1227.
- 10) Petz LD: Diagnostic complexities in autoimmune hemolytic anemias. *Transfusion*, 49: 202—203, 2009.
- 11) Shulman IA, Branch DR, Nelson JM, et al: Autoimmune Hemolytic Anemia With Both Cold and Warm Autoantibodies. *JAMA*, 253: 1746—1748, 1985.
- 12) 高崎美苗, 小野 智, 奥津美穂, 他：混合型(冷式と温式)自己免疫性溶血性貧血が疑われた患者への同種赤血球輸血. *医学検査*, 59: 799—803, 2010.
- 13) 大久保進, 石田萌子, 安永幸二郎：抗グロブリン試験で補体成分のみ認められた IgM 型 Rh 式 e 抗原特異抗体による自己免疫性溶血性貧血の 1 症例. *臨床血液*, 31: 129—130, 1990.
- 14) 西村龍夫, 上辻秀和, 奥 香世, 他：IgM 抗体による温式自己免疫性溶血性貧血の 1 女児例. *小児科臨床*, 50: 2059—2062, 1997.
- 15) 加藤宏美, 田野島玲大, 後藤晶子, 他：高度溶血発作をきたした低力価寒冷凝集素症. *日小血会誌*, 22: 47—51, 2008.

- 16) 越前屋竹寅, 藤田浩史, 大塚美穂子, 他: 低力価寒冷凝集素による高度の自己免疫性溶血性貧血を合併した風疹の1例. 日小血会誌, 7: 251—256, 1993.

DTT TREATMENT FOR STRONG AUTOAGGLUTINATION OBSERVED IN A PATIENT WITH LOW-TITER CAD

*Mika Hosokawa*¹⁾, *Kotarousumitomo Nakayama*¹⁾, *Mikiko Sakuragi*¹⁾, *Mayumi Nakao*¹⁾,
*Tamayo Morikawa*¹⁾, *Tomoko Kiyokawa*¹⁾, *Hiroshi Aochi*¹⁾, *Keisuke Nagamine*¹⁾,
*Hisashi Kato*²⁾ and *Yoshiaki Tomiyama*¹⁾

¹⁾Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital

²⁾Department of Hematology and Oncology, Osaka University Graduate School of Medicine

Abstract:

Low-titer cold agglutinin disease (CAD) is a hemolytic disorder characterized by low-titer cold agglutinin with increased thermal amplitude in the presence of albumin. Autoagglutination often occurs in CAD, and is usually reversed by warming to 37°C. In this study, we showed strong autoagglutination even at 37°C in a patient with low-titer CAD, which prevented ABO and RhD typing. To reverse the autoagglutination, we first tried to perform every step at or above 37°C, which was ineffective. Flow cytometric analysis revealed that IgM, but not IgG, was detected on the patient's erythrocytes. Next, we applied 0.01M dithiothreitol to disrupt the disulfide bonds of the IgM antibodies on the patient's erythrocytes. DTT successfully prevented autoagglutination, which enabled us to perform ABO and RhD typing. In addition, the patient's plasma interfered with alloantibody screening because of the cold agglutinin. Again, DTT treatment of the plasma was effective for inactivating IgM cold agglutinin. Our data suggest that DTT treatment is easy and effective for preventing IgM-mediated strong autoagglutination.

Keywords:

Autoagglutination, DTT treatment, Low titer cold agglutinin disease