

間接抗グロブリン試験に際しモノクローナル抗ヒトIgG 試薬が有用であった抗 JMH 保有症例

小川 公代¹⁾ 永濱 景子¹⁾ 志賀 達哉²⁾ 丸橋 隆行³⁾ 横濱 章彦³⁾

抗 JMH 保有患者の不規則抗体検査に際しては、共存する抗体の判別が困難な上、交差適合試験も不適合となり、輸血への対応に苦慮する。抗 JMH 保有患者の交差適合試験に際し、臨床的意義がないとされているサブクラス IgG4 を検出しないモノクローナル抗ヒト IgG 試薬を用いることで、有益で臨床側が安心できる検査結果を提供し得た事例を報告する。

患者は 82 歳男性。間接抗グロブリン試験 (IAT) による不規則抗体検査において、パネル赤血球全てに強陽性、自己対照は弱陽性であった。血液センターへ精査依頼し抗 JMH と同定された。フローサイトメトリーによる IgG サブクラス解析で IgG4 と判定した。IAT による交差適合試験では、ポリクローナル抗ヒト IgG 試薬では陽性を示したが、モノクローナル抗 IgG 試薬では陰性であった。モノクローナル抗 IgG 試薬による検査結果を基に輸血を施行、期待した輸血効果が得られ、溶血性副作用を認めなかった。

IgG4 を検出しないモノクローナル抗 IgG 試薬は、抗 JMH 保有患者の輸血後の同種抗体産生を確認する際に、またより安全で臨床側が安心できる交差適合試験結果報告のために有用であると考えられる。

キーワード：抗 JMH、高頻度抗原、抗ヒト IgG 試薬、IgG サブクラス 4、間接抗グロブリン試験

はじめに

抗 JMH は、1978 年に Sabo ら¹⁾によって報告された赤血球表面に高頻度に存在する John Milton Hagen (JMH) 血液型抗原に対する抗体である。高齢者に検出されることが多く、輸血副作用には関連しないことが Tregellas ら²⁾により報告されている。また赤血球型検査 (赤血球系検査) ガイドライン³⁾に於いても、抗 JMH 保有患者に対する赤血球製剤 (red blood cells ; RBC) の準備に際しては抗原陰性血を選択する必要はないとされている。実際、抗 JMH 保有患者に対し JMH 陽性赤血球の輸血が行われても、溶血性副作用を起こすことなく経過していることが殆どである^{4)~10)}。

しかし輸血前に行われる不規則抗体検査では、患者検体は医療機関が通常保有しているパネル赤血球とは全て反応するため同定はほぼ不可能であり、更に輸血歴のある患者では抗 JMH 以外の同種抗体の共存の精査が困難であるという問題点を有する。また、交差適合試験では殆どの供血者赤血球と陽性反応を示し不適合となるため、医療機関では輸血への対応に苦慮しているのが現状である。

今回、抗 JMH 保有患者の交差適合試験に際し、臨床的意義がないとされているサブクラス IgG4 を検出しないモノクローナル抗ヒト IgG 試薬を用いることで、有益で臨床側が安心できる検査結果を提供し得たので、本試薬の有用性と併せて報告する。

症例及び経過

患者は 82 歳男性。血液型は AB 型 RhD 陽性, CCee, MNss, Le (a-b+), Fy (a+b-), Jk (a-b+), Di (a-)。2009 年に大動脈弁置換術を施行、術前の不規則抗体検査は陰性であった。2014 年に失神症状を呈し、ペースメーカー植込み術施行目的に緊急入院となった。輸血歴は当院ではなし、他院では直近約 2 年間はなし、それ以前は不明。入院時ヘモグロビン値 (Hb) 7.5g/dl と貧血を認め、入院 10 日後に Hb6.5g/dl と貧血が進行したため RBC 輸血が依頼された。

検査方法および試薬

1. 輸血前検査

新輸血検査の実際初版¹¹⁾に従い、以下の検査を実施した。

1) 群馬県立心臓血管センター技術部

2) 群馬県立心臓血管センター麻酔科

3) 群馬大学医学部附属病院輸血部

〔受付日：2017 年 8 月 15 日、受理日：2017 年 12 月 21 日〕

1) 不規則抗体検査

①スクリーニング検査

試験管法にて生理食塩液法及びポリエチレングリコール間接抗グロブリン試験 (PEG-IAT) を行った。また、カラム凝集法はオートビュー[®]Innova(オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス社, 以下オーソ)を使用し、酵素法及び低イオン強度溶液 (LISS)-IATを実施した。

パネル赤血球試薬はサージスクリーン[®]とディエゴ A 血球, PEG 試薬はオーソ[®]PEG, LISS 試薬はオーソ[®]エンハンスメントソリューション, 酵素試薬は Ficin(何れもオーソ)を使用した。

②自己抗体吸着法

温式自己抗体の可能性を考慮し, PEG を用いた自己抗体吸着法を実施した。実施後の上清を用いて不規則抗体検査を IAT にて実施した。

③同定および抗体価測定

院内検査では同定不能であったため, 血液センターへ精査依頼した。また, 反応増強剤無添加 IAT (Sal-IAT) にて抗体価及びスコアを測定した。

抗 IgG 試薬は, スクリーニング検査についてはオーソ[®]抗ヒト IgG 血清 (ポリクロ抗 IgG; オーソ) 及びガンマクロン抗 IgG 血清 (モノクロ抗 IgG; 株式会社イムコア) を用い, その他の検査はポリクロ抗 IgG を使用した。

2) 直接抗グロブリン試験 (DAT) 及び抗体解離試験

多特異性抗体であるオーソ[®]クームス血清バイオクロン (オーソ) 及びポリクロ抗 IgG を用い DAT を行った。また, オーソ[®]DT 解離液 II (オーソ) を用いて抗体解離試験を行い, 解離液の希釈系列を用いて PEG-IAT を実施, 患者赤血球に結合している抗体の有無及び特異性を調べた。

3) 交差適合試験

供血者 2 名について試験管法による生理食塩液法,

PEG-IAT 及び Sal-IAT を実施した。PEG 試薬及び抗ヒト IgG 試薬は不規則抗体スクリーニング検査と同一試薬を使用した。

2. IgG サブクラス検査

フローサイトメトリー法を用いて抗 JMH の IgG サブクラスを検査した。患者血清と O 型 JMH 抗原陽性赤血球を 37°C, 1 時間反応させ, phosphate-buffered saline (PBS) 洗浄後, 10 倍希釈 FITC 標識 Sheep Anti-Human IgG1~IgG4 (Binding Site 社) を添加し 4°C 1 時間反応させた。PBS 洗浄後, BD FACS Canto II (ベクトン・ディッキンソン社) で測定し FACS Diva ソフトウェアにて解析した。陰性対照として不規則抗体陰性 AB 型血漿を用い, mean fluorescent intensity (MFI) について患者検体 (S) と陰性対照 (N) の蛍光強度比 (S/N) が 2.0 以上を陽性とした。

3. 抗ヒト IgG 試薬の感度比較

ポリクロ抗 IgG とモノクロ抗 IgG の感度を比較するため, 国際単位表示の抗 D (リファレンス抗 D コントロールキット Anti-D 0.05IU/ml, オーソ) の希釈系列を用いて PEG-IAT を行った。

検査結果

1. 輸血前検査

1) 不規則抗体検査

①スクリーニング検査

生理食塩液法は陰性, PEG-IAT では, ポリクロ抗 IgG を用いた場合は全てのパネル赤血球に 3+ の強陽性, 自己対照は 1+ の弱陽性であったが, IgG4 を検出しない特徴を持つモノクロ抗 IgG を用いた場合は自己対照を含め全て陰性であった (Table 1)。LISS-IAT では全てのパネル赤血球が 2+, Ficin 法では全てのパネル赤血球が陰性であった。

以上の結果から, 酵素法で反応しない, サブクラス IgG4 の高頻度抗原に対する抗体, もしくは自己抗体が

Table 1 Result of indirect antiglobulin testing for antibody screening

Alloantibody screening method	Panel cells				Autocontrol
	I	II	III	IV	
Saline Method	0	0	0	0	0
PEG-IAT (Polyclonal)	3+	3+	3+	3+	1+
PEG-IAT (Monoclonal)	0	0	0	0	0
LISS-IAT (Polyclonal)	2+	2+	2+	NT	NT
Ficin Method	0	0	0	NT	NT
PEG-IAT by adsorbed sera (Polyclonal)	2+	2+	2+	2+	NT
PEG-IAT by DT elution (Polyclonal)	3+	3+	3+	3+	NT

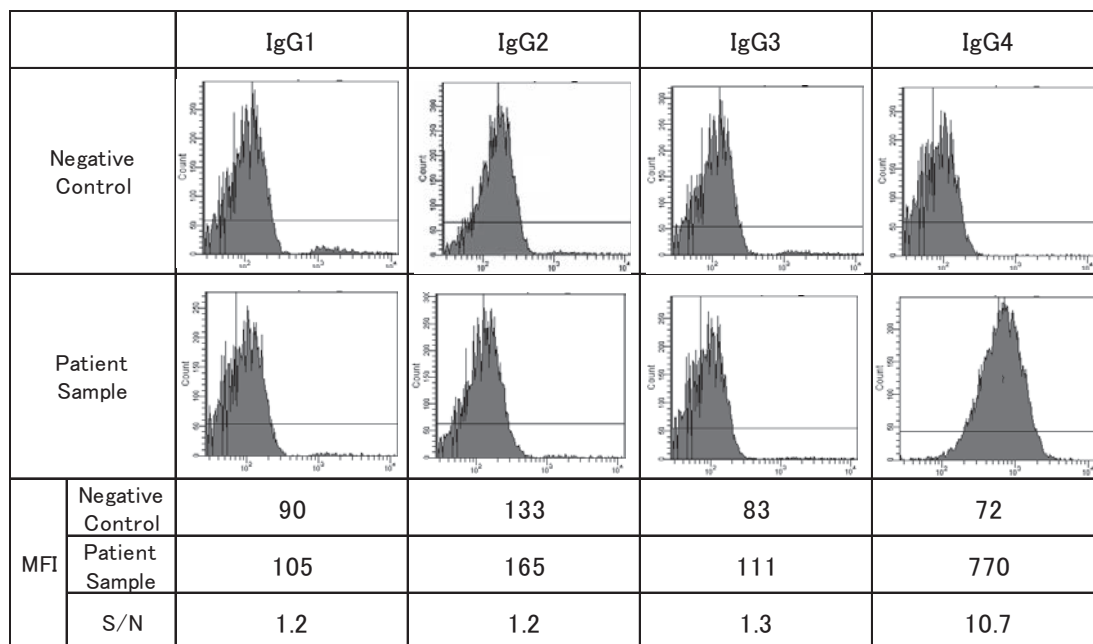
Polyclonal: using polyclonal anti-human IgG

Monoclonal: using monoclonal anti-human IgG

PEG-IAT: polyethylene glycol-enhanced indirect antiglobulin test

DT: dichloromethane dichloropropane

NT: not test



X axis: fluorescence intensity on a logarithmic scale

Y axis: number of cells

MFI: mean fluorescence intensity

S/N: patient sample/negative control

Fig. 1 Histogram patterns of IgG subclass using flow cytometry

S/N of the mean fluorescence intensity in flow cytometry was positive for IgG4 only, which indicates that the IgG subclass of this antibody is IgG4.

Table 2 Comparison of the sensitivity of polyclonal anti-human IgG with monoclonal anti-human IgG

Anti-human IgG reagent	Anti-D (IU/ml)			
	5×10^{-2}	2.5×10^{-2}	1.25×10^{-2}	0.625×10^{-2}
Polyclonal	2+	1+	1+	0
Monoclonal	2+	1+	1+	0

疑われた。

②自己抗体吸着法

PEG吸着後血清を用いたIATによる不規則抗体検査では、全てのパネル赤血球に2+の凝集を示した (Table 1)。

③同定および抗体価測定

血液センターにおける検査の結果、患者血液型はJMH抗原陰性、患者血清とJMH陰性パネル赤血球5本とのPEG-IATは何れも陰性で、抗JMHと同定された。その他の不規則抗体は認められなかった。

抗体価は256倍、スコアは83であった。

2) DAT及び抗体解離試験

DATではオーソ[®]クームス血清バイオクロン及びポリクロ抗IgGの何れも1+の弱陽性、生理食塩液対照は陰性であった。解離液の抗体価は32倍を示し、パネル赤血球間で凝集強度に差を認めず、抗体の型特異性を認めなかった (Table 1)。

3) 交差適合試験

ポリクロ抗IgGを用いたPEG-IAT及びSal-IATでは何れも2名の供血者赤血球と3+の強陽性であったが、モノクロ抗IgGを用いた場合は自己対照を含め全て陰性であった。

2. IgGサブクラス検査

IgG1, IgG2, IgG3のS/Nは2.0未満で陰性、IgG4のみがS/N10.7と陽性を示した (Fig. 1)。

3. 抗ヒトIgG試薬の感度比較

ポリクロ抗IgG, モノクロ抗IgGともに抗D 1.25×10^{-2} IU/mlまで1+の凝集を示し、両試薬の感度に差は認められなかった (Table 2)。

患者への輸血対応及び輸血効果

モノクロ抗IgGを用いた交差適合試験結果を臨床側へ報告、これを基にRBC2単位の輸血が連続2日間施行された。RBCはAB型の院内在庫血を使用し、免疫原性が比較的高い主要な抗原を一致させた製剤選択は考慮しなかった。

輸血前Hb6.5g/dlに対し、RBC4単位輸血後はHb9.0g/dlまで上昇、期待した輸血効果が得られた。その18日後に軽快退院するまでHbの低下は見られず、溶血性副作用の指標となる検査値の著明な上昇も認められなかった (Fig. 2)。

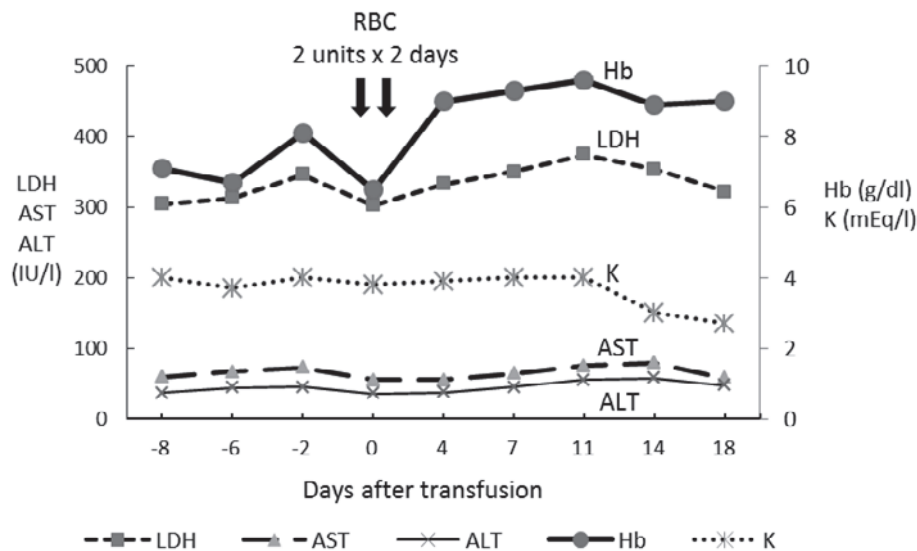


Fig. 2 Clinical course of laboratory examinations

Post-transfusion hemoglobin increased to the expected level as compared to its pre-transfusion level, indicating no occurrence of post-transfusion hemolytic side effects.

考 察

本症例は、輸血前検査の IAT において全てのパネル赤血球と反応し DAT も陽性であったため、高頻度抗原に対する抗体または自己抗体を保有していることが疑われた。赤血球型検査ガイドライン³⁾に示されるなどの反応態度にも合致しないため鑑別が困難であったが、精査の結果、抗 JMH を保有していることが判明した。抗 JMH は IgG4 主体の高頻度抗原に対する抗体であり、JMH 抗原の減弱に伴い産生されることが報告されている¹²⁾。赤血球結合抗体の特異性は同定していないが、DAT 陽性の原因として、患者の赤血球に残存する微量の JMH 抗原に抗 JMH が結合している可能性が推察された。

抗 JMH は、赤血球製剤の選択に際し抗原陰性血を選択する必要は無い³⁾とされているものの、不規則抗体検査や交差適合試験に際しては次の 3 つの問題点が存在する。

第一に、通常の IAT ではパネル赤血球との反応は全て陽性となるため、一般医療機関では同定が困難であり、迅速な血液製剤の準備に支障をきたすという点である。

第二に、血液センターにて同定後の最初の輸血については安全だが、輸血歴のある患者の夜間、緊急時の輸血に際しては抗 JMH 以外の同種抗体の共存の精査が困難であるため、同種抗体による輸血副作用が懸念されるという点である。

第三に、臨床医への結果報告の問題である。交差適合試験の結果は陽性即ち検査上不適合であるが使用可能であるとの報告は、検査結果と製剤の使用可否の判断が直結せず矛盾を抱えることになる。

これら 3 つの問題点は、IAT の実施に際し、遅発性溶血性輸血副作用の主な原因とされる IgG1 及び IgG3¹³⁾ を確実に検出し、臨床的意義が無いとされる^{2)~4)} IgG4 を検出しないモノクロー抗 IgG を用いることで解決可能と考えられる。モノクロー抗 IgG 試薬は、抗 JMH 保有患者の輸血後の同種抗体産生を見極め適切な製剤準備に資することが可能であり、また臨床側へ安心できる交差適合試験結果を報告するために有用であると考えられ、赤血球型検査ガイドラインにもその記載が望まれる。

現在広く用いられているポリクロー抗 IgG は赤血球に対する IgG を広範囲に検出することが可能という点で有用であるが、これに加えモノクロー抗 IgG を併用することで、緊急時の製剤選択が可能となり、より安全で安心できる検査体制となり得るものと思われる。更に PEG 吸着後の血清や解離試験における解離液の反応にも応用することで、抗体の推定に役立つと期待される。

モノクロー抗 IgG は、DAT 及び IAT の検出感度の向上と非特異反応の減少を目的に作られた IgM 型の試薬であり¹⁴⁾、ポリクロー抗 IgG に比べ、IAT の試験管法において温式抗体の反応強度が若干増強し、特に HTLA (高力価低凝集力) 抗体の力価が 2~3 管増強したとの基礎的検討も報告されている¹⁵⁾。今回我々の検討では、国際単位表示の抗 D の希釈系列を用いた PEG-IAT で両試薬の感度は同等であった。IAT の検査過程において、モノクロー抗 IgG の添加後は数分の放置で反応が減弱するため、速やかに遠心、判定する必要がある¹⁵⁾。各々の試薬の特性を見極めたうえで必要に応じて使い分けることで、検出感度の向上と効果的な検査体制に十分貢

献できると考える。

まとめ

今回、抗 JMH 保有患者の交差適合試験に際し、臨床的意義のない IgG4 の凝集反応を回避できるモノクロー抗 IgG 試薬を併用することで、臨床側が安心できる結果報告が可能であった。高頻度抗原に対する抗体が疑われる場合や抗 JMH 保有患者の輸血後の同種抗体産生を確認する際に、必要に応じてモノクロー抗 IgG 試薬を併用することは有用であると考えられた。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞：稿を終えるにあたり、不規則抗体の同定とご校閲を頂きました日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センターの五十嵐寛幸先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Sabo B, Moulds J, McCreary J: Anti-JMH: another high titer-low avidity antibody against a high frequency antigen. *Transfusion*, 18: 387, 1978.
- 2) Tregellas WM, Pierce SR, Hardman JT, et al: Anti-JMH: IgG subclass composition and clinical significance. *Transfusion*, 20: 628, 1980.
- 3) 赤血球型検査ガイドライン改訂タスクフォース：赤血球型検査（赤血球系検査）ガイドライン（改定 2 版）. 日本輸血細胞治療学会誌, 62: 651—663, 2016.
- 4) Baldwin ML, Ness PM, Barrasso C, et al: In vivo studies of the long term ⁵¹Cr red cell survival of serologically incompatible red cell units. *Transfusion*, 25: 34—38, 1985.
- 5) Whitsett CF, Moulds M, Pierce JA, et al: Anti-JMH identified in serum and in eluate from red cells of a JMH-negative man. *Transfusion*, 23: 344—345, 1983.
- 6) 山本律子, 河合建志, 米田孝司, 他：抗 JMH 抗体保有患者への輸血の影響. 医学検査, 46: 634, 1997.
- 7) 樋本由香里, 細川美佐子, 多田一美, 他：JMH 抗体を検出, 輸血の経過を観察した 1 症例. 日本輸血学会誌, 46: 578, 2000.
- 8) 石凌統夫, 稲川美実, 飯野幸永：抗 JMH 抗体保有患者に行った輸血の 1 症例. 医学検査, 52: 532, 2003.
- 9) 福地信昭, 三浦佳乃, 石丸 健, 他：抗 JMH 保有患者における輸血の 2 症例. 医学検査, 57: 596, 2008.
- 10) 松本弥生, 山田麻里江, 夏秋正文, 他：抗 JMH 保有患者で抗原陽性輸血を実施した 1 症例. 日本輸血細胞治療学会誌, 60: 90, 2014.
- 11) 日本臨床衛生検査技師会「新輸血検査の実際」編集部会：新輸血検査の実際 初版, 日本臨床衛生検査技師会, 東京, 2008.
- 12) 内川 誠：赤血球型, 編者 遠山 博, 柴田洋一, 前田平生, 他, 輸血学改訂第 3 版, 中外医学社, 東京, 2004, 358.
- 13) 内川 誠：赤血球型に関する検査, 編者 遠山 博, 柴田洋一, 前田平生, 他, 輸血学改訂第 3 版, 中外医学社, 東京, 2004, 380—389.
- 14) ガンマクロン抗 IgG 試薬添付文書第 3 版, イムコア, 2011.
- 15) 土手内靖, 尾崎牧子, 西山記子, 他：「ガンマクロン抗 IgG」の基礎的検討. 日赤検査, 48: 43—46, 2015.

USEFULNESS OF MONOCLONAL ANTI-HUMAN IgG REAGENT IN THE INDIRECT ANTIGLOBULIN TEST FOR A PATIENT WITH THE ANTI-JOHN MILTON HAGEN BLOOD GROUP

Kimiyo Ogawa¹⁾, Keiko Nagahama¹⁾, Tatsuya Shiga²⁾, Takayuki Maruhashi³⁾ and Akihiko Yokohama³⁾

¹⁾Department of Medical Techniques, Gunma Prefectural Cardiovascular Center

²⁾Department of Anesthesia, Gunma Prefectural Cardiovascular Center

³⁾Blood Transfusion Service, Gunma University Hospital, Faculty of Medicine, Gunma University Graduate School of Medicine

Abstract:

The pre-transfusion test for patients with anti-John Milton Hagen (JMH), an antibody against high-frequency antigens, has been associated with difficulty in the identification of irregular antibodies as well as incompatibility with the cross-match test. Thus, establishing a transfusion for these patients can be problematic. Although anti-JMH usually exhibits IgG4 subclass, IgG4 appears to be of no clinical significance. We found that monoclonal anti-human IgG reagent, which had no reactivity to IgG4, provided useful information in compatibility testing in a patient with anti-JMH.

An 82-year-old male patient underwent a cross-match test via an indirect anti-globulin test, and was positive for the polyclonal anti-human IgG reagent but negative for the monoclonal version. Anti-JMH was identified in the test results at Japanese Red Cross Blood Center. An IgG subclass analysis using flow cytometry showed IgG4 positivity.

Based on the results of the monoclonal anti-human IgG reagent test, transfusion was performed. The expected outcome of the transfusion was achieved with no hemolytic side effects.

A monoclonal anti-human IgG reagent that does not react with IgG4 seems to be useful for checking alloantibody production after transfusion, and enables the reporting of cross-match test results that are valid for treatment, particularly in patients with anti-JMH.

Keywords:

Anti-JMH, High-frequency antigens, Anti-human IgG reagent, Subclass IgG4, Indirect anti-globulin test