

自己抗体保有患者の同種抗体検出における LISS を用いた自己抗体吸着法の有用性の検討

上床 貴代¹⁾ 渡邊 千秋¹⁾ 伊藤 誠¹⁾ 魚住 諒¹⁾ 林 泰弘¹⁾
 高橋秀一郎¹⁾²⁾ 宮下 直洋²⁾ 白鳥 聡一²⁾ 橋本 大吾²⁾ 杉田 純一¹⁾²⁾
 早瀬 英子¹⁾²⁾ 秋沢 宏次¹⁾ 豊嶋 崇徳¹⁾²⁾

＜背景＞自己抗体保有患者は自己抗体の他に同種抗体を保有する頻度が多いため¹⁾²⁾、共存する同種抗体の検出が重要となる。ポリエチレングリコール(PEG)吸着法は自己抗体吸着法として一般的に用いられているが、低力価の同種抗体も吸着されると指摘する報告がある³⁾⁴⁾。海外では低イオン強度溶液(low ionic strength solution ; LISS)を用いた自己抗体吸着法(以下 LISS 吸着法)も短時間での自己抗体吸着において有用であるという報告⁵⁾があるが本邦では一般的ではない⁶⁾。今回我々は LISS 吸着法が同種抗体の検出に有用であった3症例を経験したので報告する。
 ＜方法＞自己抗体を保有する3患者において LISS 吸着法を行った。3カ月以内に輸血のない患者は自己赤血球を用い、輸血のある患者は患者と Rh, Kidd, Diego 同型の酵素処理した他家赤血球を用いて自己抗体の吸着を行い、上清で同種抗体の検索を行った。＜結果＞3例共に LISS 吸着法にて同種抗体が検出された。＜考察＞LISS 吸着法は自己抗体の吸着および、共存する同種抗体の検出において有用であると考えられた。

キーワード：自己抗体、自己抗体吸着、LISS 吸着法、同種抗体

緒言

自己赤血球抗原に対する自己抗体は主に自己免疫性溶血性貧血(autoimmune hemolytic anemia ; AIHA)患者で検出されるが、悪性腫瘍や敗血症等の非 AIHA 患者においても検出されることがある⁷⁾。自己赤血球抗原に対する自己抗体保有患者は、血液型検査や不規則抗体検査等で非特異的な反応により検査の判定に苦慮することが多い。また、自己抗体保有患者は自己抗体の他に同種抗体を保有する頻度が多いという報告があり¹⁾²⁾、同種血輸血による溶血性輸血副作用を回避するためにも共存する同種抗体の検出が重要となる。共存する同種抗体の検出には自己抗体による非特異的な反応の影響を取り除くため、患者血液中の自己抗体を吸着・除去した後に同種抗体の検索を実施する必要がある。自己抗体吸着法としてポリエチレングリコール(PEG)を用いた PEG 吸着法は、操作が簡便かつ短時間で可能なため一般的によく用いられている。しかし PEG 吸着法はグロブリンを沈殿させる性質があるため、自己抗体と共に低力価の同種抗体も沈殿し、同種抗体が検出できなくなる場合があるとの報告もある³⁾⁴⁾。海外では低イオン強度溶液(low ionic strength solution ; LISS)

を用いた自己抗体吸着法(以下 LISS 吸着法)も短時間での自己抗体吸着において有用であるという報告があるが⁵⁾本邦では一般的ではない⁶⁾。また、自己抗体の吸着に用いる赤血球は3カ月以内に輸血がなければ自己赤血球を用いることができるが、高力価の自己抗体が感作した患者赤血球を用いる場合は抗体解離後に自己抗体の吸着を行う必要がある。しかし、抗体解離には限界があり、十分な抗体解離ができず、その後の自己抗体吸着が不十分となり、患者血液中の自己抗体の影響が残存し同種抗体の検索ができないこともしばしばある。さらに、抗体解離を実施する場合、抗体解離操作に最大2時間を要する場合もあるため、検査時間が長くなる傾向がある。また、3カ月以内に輸血がある場合は自己赤血球を自己抗体の吸着に用いることはできないため、患者の Rh, Kidd 同型の同種赤血球を用いて自己抗体の吸着に用いることが推奨されている⁸⁾。

今回我々は、LISS 吸着法が共存する同種抗体の検出に有用であった自己抗体保有患者3例を経験したので報告する。

1) 北海道大学病院検査・輸血部

2) 北海道大学大学院医学研究院内科学分野血液内科学教室

〔受付日：2018年8月6日，受理日：2018年10月16日〕

表1 患者背景

| | 症例1 | 症例2 | 症例3 |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| 原疾患 | AIHA | 悪性黒色腫 | 骨髄異形成症候群 |
| 溶血所見 | なし | なし | なし |
| 3カ月以内の輸血歴 | なし | あり | あり |
| 直接抗グロブリン試験 | 抗IgG (w+) | 抗IgG (2+) | 抗IgG (3+) |
| | 抗補体 (w+) | 抗補体 (0) | 抗補体 (0) |
| 間接抗グロブリン試験 | パネル赤血球 (w+) | パネル赤血球 (1+) | パネル赤血球 (w+) |
| Sal-IAT | 自己対照 (w+) | 自己対照 (3+) | 自己対照 (2+) |

症例1～3の患者背景. AIHA: autoimmune hemolytic anemia. Sal-IAT: 反応増強剤無添加間接抗グロブリン試験.

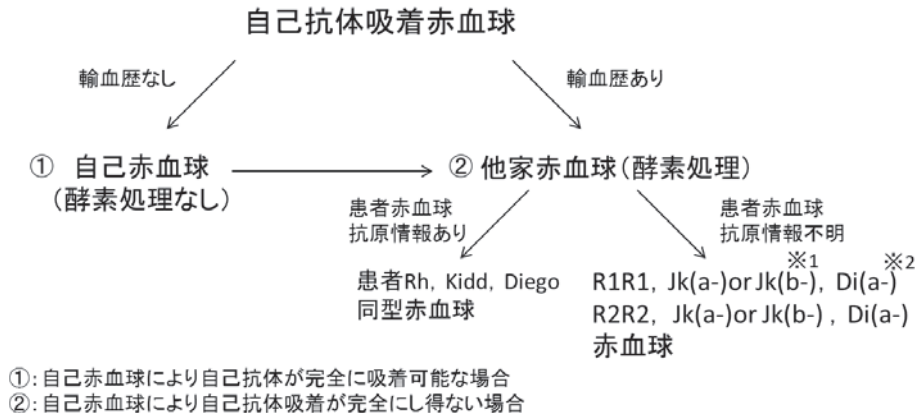


図1 自己抗体の吸着に用いる赤血球の選択の基準

※1: 2種類の赤血球のうち Jk (a-) および Jk (b-) を選択. ※2: 2種類の赤血球のどちらかで Di (a-) を選択.

対象および方法

患者背景を表1に示す. 自己抗体保有3症例にPEGとLISSによる吸着法を実施し, 同種抗体の検出の有無を比較した.

1. 対象

症例1

70代女性. 12年前よりAIHAで無治療経過観察中. 溶血所見なし. 3カ月以内の輸血歴なし. 直接抗グロブリン試験(DAT)は抗IgG(w+), 抗補体(w+)であった. AIHA診断時に自己抗体の他に, PEG吸着法にて抗Sが検出されていた.

症例2

90代男性. 悪性黒色腫. 溶血所見なし. DATは抗IgG(2+), 抗補体(0)であった. 3カ月以内の輸血歴あり. 初回輸血時に自己抗体が検出され, 患者の赤血球抗原は輸血前の検体を用いて検査を施行した.

症例3

70代男性. 骨髄異形成症候群. 溶血所見なし. 3カ月以内の輸血歴あり. 不規則抗体陰性. 頻回に輸血を実施していたが, 輸血療法中に自己抗体が検出された. DATは抗IgG(3+), 抗補体(0)であった.

2. 方法

1) 自己抗体の吸着に用いる赤血球の選択

自己抗体の吸着に用いる赤血球の選択の基準を図1に示す.

3カ月以内に輸血歴がなく, 自己赤血球で自己抗体が完全に吸着可能な場合は, 吸着に自己赤血球を用いた. 3カ月以内に輸血歴があった場合は患者とRh, Kidd, Diego同型の他家赤血球を用いた. 3カ月以内に輸血歴があり, 患者赤血球抗原が不明の場合はR₁R₁(CCDee), Jk(a+b-), Di(a-)赤血球と, R₂R₂(ccDEE), Jk(a-b+)Di(a-)の2種類の他家赤血球を用いた. 他家赤血球は赤血球液(RBC)のセグメントチューブ(5本)から得た.

2) 吸着用赤血球の酵素処理

自己抗体吸着用の他家赤血球は, Duffy, MNS抗原を破壊し吸着効率を上げる目的で, 他家赤血球沈層と等量のプロメリン溶液[®](イムコア)を混和し, 37°Cで15分間反応させた後, 洗浄して使用した.

3) PEG吸着法⁹⁾

患者自己赤血球または酵素処理した他家赤血球沈層: 患者血漿: PEG=1:1:1で混和し, 37°Cで10分間加温して反応させた後, 3,000rpmで5分間遠心後の上清を用いて同種抗体の検索を試験管法にて実施した. PEGはガンマPEG[®](イムコア)を用いた.

4) LISS吸着法⁵⁾

1. 吸着用赤血球を3回洗浄する。
2. 赤血球沈層と等量のプロメリン溶液を加えて混和し、37°C 15分間反応させる。
3. 赤血球を3回洗浄する。
4. 赤血球：患者血漿：LISS=2：1：1の比率で混和し、37°C 10分間反応させる。
5. 3000rpm 5分間遠心する。
6. 上清を用いて、カラム凝集法にて不規則抗体検査を実施する。
(上清 80μL + スクリーニング赤血球またはパネル赤血球 10μL)

図2 LISS吸着法の方法
吸着赤血球は自己抗体の吸着に用いる赤血球の選択基準に準ずる。

表2 自己抗体吸着法別の結果

| | 症例1 | 症例2 | 症例3 |
|------------------------|----------------|--|--|
| 吸着に用いた赤血球 | 自己赤血球 (未処理) | 患者と Rh, Kidd, Diego 同型他家赤血球 (酵素処理) | R1R1 (CCDee), Jk (a+b-), Di (a-) R2R2 (ccDEE), Jk (a-b+), Di (a-) 他家赤血球 (酵素処理) |
| PEG 吸着法 | 陰性 | 陰性 | NT |
| LISS 吸着法 (検出抗体反応強度) | 抗 S 検出 (1+) | 抗 S 検出 (1+) | 抗 E 検出 (1+) |

症例1～3の自己抗体吸着後の結果。PEG：ポリエチレングリコール。LISS：低イオン強度溶液。NT：Not tested.

Jacques らによる LISS 吸着法⁵⁾の赤血球：患者血漿：LISS の比率を一部改変し実施した(図2)。患者自己赤血球または酵素処理した他家赤血球沈層：患者血漿：LISS=2：1：1で混和し、37°C で10分間加温して反応させた後、3,000rpm で5分間遠心後の上清でオーツ[®]バイオビュー抗 IgG カセット(オーツ・クリニカル・ダイアグノスティックス)を用いてカラム凝集法にて同種抗体の検索を実施した。LISS はオーツ[®]エンハンズメント ソリューション(O.A.E.S.)(オーツ・クリニカル・ダイアグノスティックス)を用いた。

結 果

3例の検査結果を表2に示す。症例1はDATが(w+)であり、3カ月以内に輸血歴がなかったため、自己抗体の吸着には自己赤血球を用いた。AIHA 診断時にPEG吸着法にて抗Sが同定されたが、本検討時点ではPEG吸着法で検出されなかった。しかし、LISS吸着法では抗Sが検出された。症例2は3カ月以内の輸血歴があり、初回輸血前に患者赤血球抗原を調べていたため、患者と Rh, Kidd, Diego 同型の家赤血球を自己抗体吸着に用いた。PEG吸着法にて同種抗体は陰性であったが、LISS吸着法にて抗Sが検出された。PEG吸着法と同様の赤血球、患者血漿、LISSの比率での自己抗体吸着は、吸着が不十分であった。症例3は輸血後に自己抗体が検出され、患者抗原の確認ができなかったため、R1R1 (CCDee), Jk (a+b-), Di (a-) 赤血球と、R2R2 (ccDEE), Jk (a-b+) Di (a-) の2種類の他家赤血球を用いた。検体量と2種類の他家赤血球の量に限りがあったため、LISS吸着法のみ実施したと

ころ、抗Eが検出された。

考 察

自己抗体は全ての赤血球と汎凝集反応を起こすため、不規則抗体検査や交差適合試験に影響を及ぼし、自己抗体の反応によって低力価の同種抗体は隠されてしまい検出困難となる。同種抗体の検出には、自己抗体の影響を可能な限り取り除くことが必要である。自己抗体の吸着法には様々な方法があるが、簡便で操作時間が短いPEG吸着法が一般的に使用されている。しかし、PEGにはγグロブリンを沈殿させる作用があり、自己抗体と共に低力価の同種抗体も沈殿させてしまう⁶⁾。本症例ではPEG吸着法を実施した2例において、PEG吸着法で検出されなかった同種抗体がLISS吸着法にて検出されており、PEGにより同種抗体が沈殿したことが示唆された。また、PEG吸着法が実施できなかった1例においてもLISS吸着法にて自己抗体の吸着と同種抗体が検出可能であった。

LISSの抗原抗体反応増強作用はPEGと同等または若干弱く¹⁰⁾、また、症例2において、PEG吸着法と同様の赤血球、患者血漿、LISSの比率による自己抗体吸着は吸着が不十分であったため、LISS吸着法はPEG吸着法と同等の効果には及ばないと考えられた。今回の検討では抗体を吸着させる赤血球の量を増やし、より自己抗体が吸着する抗原量を増加させて吸着を促進させる工夫を施したことで吸着が十分可能であったと考えられた。また、吸着効率を上げる目的で他家赤血球を酵素処理した。

他家赤血球を酵素処理する利点として、吸着効率を

上げることの他に、赤血球の Duffy や MNS 抗原を破壊することによりこれらの抗原に対する抗体が存在している場合でも抗体が検出可能となる点が挙げられる。しかし、患者が Kell 抗原に対する抗体、特に抗 K を保有していた場合、自己抗体吸着に用いる他家赤血球が K 抗原陽性であると、抗 K が吸着されてしまい、検出不能となる。Kell 抗原に対する抗体を考慮する場合は、自己抗体吸着に用いる他家赤血球の Kell 抗原を確認するのが望ましいと考えられる。しかし、日本人の Kell 抗原の頻度は K-k+ のタイプが 99.9% 以上¹¹⁾であることから、抗 K を保有し、かつ自己抗体吸着に用いる他家赤血球が K 抗原陽性である可能性は極めて低い。

自己赤血球を自己抗体の吸着に用いる欠点として、次の4点が考えられる。1点目は、自己抗体保有患者の多くが貧血であり、吸着用の赤血球量が少ない点、2点目は、高力価の自己抗体保有患者で自己赤血球を用いて自己抗体吸着を実施する際、抗体解離後に自己抗体の吸着を行うが、抗体解離には限界があり、十分な抗体解離ができないために自己抗体吸着がしきれず、自己抗体の影響が残存するため同種抗体の検出ができない場合がある点、3点目は、抗体解離操作は最大2時間かかることから、抗体解離操作の分検査時間が延長する点、4点目は3カ月以内に輸血歴がある患者は自己赤血球を自己抗体の吸着に使用できない点である。一方、他家赤血球を自己抗体の吸着に用いることで、他家赤血球は抗体未感作のため、抗体が感作した自己赤血球よりも吸着効率が良いと考えられる。さらに、抗体解離操作が不要のため、検査時間短縮に繋がると考えられる。また、輸血歴のある患者においても自己抗体吸着は可能である。

結 語

本症例において LISS 吸着法は自己抗体吸着および共存する同種抗体の検出に有用であった。

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) Norbert A, Axcel P, Andreas K, et al: Coexistence of autoantibodies and alloantibodies to red bloodcells due to blood transfusion. TRANSFUSION, 47: 813—816, 2007.
- 2) Maley M, Bruce DG, Babb RG, et al: The incidence of red cell alloantibodies underlying panreactive warm autoantibodies. Immunohematology, 21: 122—125, 2005.
- 3) 延野真弓, 道野順子, 多葉田祥代, 他: Peg 自己抗体吸着法が同種抗体に及ぼす影響. 日本輸血・細胞治療学会誌, 51: 248, 2005.
- 4) Judd WJ, Dake L: PEG adsorption of autoantibodies causes loss of concomitant alloantibody. Immunohematology, 17: 82—85, 2001.
- 5) Jacques C, Mohammed T, Magali M, et al: Adsorption of autoantibodies in the presence of LISS to detect alloantibodies underlying warm autoantibodies. TRANSFUSION, 43: 651—655, 2003.
- 6) 丸橋隆行, 須佐 梢, 西本奈津美, 他: 自己免疫性溶血性貧血患者における自己抗体吸着法の比較—LISS を用いた自己抗体吸着法の基礎的検討—. 医学検査, 65(2): 151—158, 2016.
- 7) 山口 瞳, 杉本達哉, 前沢由美子, 他: 赤血球自己抗体陽性患者への赤血球輸血の解析. 日本輸血・細胞治療学会誌, 63: 95—104, 2017.
- 8) 室井一男: 赤血球型検査(赤血球系検査)ガイドライン, 改訂2版, 日本輸血・細胞治療学会, 2016.
- 9) 安藤高宣, 伊藤正一, 石丸 健, 他: 輸血・移植検査技術教本, 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会, 2016, 93.
- 10) 菱沼智子, 伊藤正一, 荻山佳子, 他: 赤血球抗体とホモ・ヘテロ接合型抗原血球との反応性について. 日本輸血・細胞治療学会誌, 61: 435, 2015.
- 11) 安藤高宣, 伊藤正一, 石丸 健, 他: 輸血・移植検査技術教本, 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会, 2016, 19—20.

UTILITY OF LISS AS AN AUTOANTIBODY ADSORPTION METHOD FOR DETECTION OF COEXISTING ALLOANTIBODIES IN PATIENTS WITH AUTOANTIBODIES

*Takayo Uwatoko*¹⁾, *Chiaki Watanabe*¹⁾, *Makoto Ito*¹⁾, *Ryo Uozumi*¹⁾, *Yasuhiro Hayashi*¹⁾,
*Shuichiro Takahashi*¹⁾²⁾, *Naohiro Miyashita*²⁾, *Souichi Shiratori*²⁾, *Daigo Hashimoto*²⁾, *Junichi Sugita*¹⁾²⁾,
*Eiko Hayase*¹⁾²⁾, *Koji Akizawa*¹⁾ and *Takanori Teshima*¹⁾²⁾

¹⁾Division of Laboratory and Transfusion Medicine, Hokkaido University Hospital

²⁾Department of Hematology, Hokkaido University Faculty of Medicine

Abstract:

Background: Detection of coexisting alloantibodies is important because patients with autoantibodies often also have alloantibodies. The polyethylene glycol (PEG) adsorption method is a commonly used autoantibody adsorption method. However, the PEG adsorption method reportedly also adsorbs low titers of alloantibodies. While there are reports that an autoantibody adsorption method that uses low ionic strength solution (LISS) is a quick and useful autoantibody adsorption method, this method is not commonly used in Japan. We report 3 cases for which the LISS adsorption method was useful for autoantibody adsorption and detection of coexisting alloantibodies.

Patients and Methods: We used the LISS adsorption method for autoantibody adsorption in 3 patients with autoantibodies. Autoantibodies of one patient who had not received a transfusion within the previous 3 months were adsorbed using autologous red blood cells (RBCs), while those of the remaining two patients who received a transfusion within the previous 3 months were adsorbed using Rh-, Kidd- and Diego-matched enzyme-treated allogeneic RBCs.

Results: Low-titer alloantibodies were detected in all 3 cases using the LISS adsorption method.

Conclusion: The detection of low-titer alloantibodies using the LISS adsorption method suggests efficient adsorption of autoantibodies. Therefore, the LISS adsorption method is useful for detecting coexisting alloantibodies in patients with autoantibodies.

Keywords:

Autoantibody, autoantibody adsorption, LISS adsorption method, alloantibody