

フローサイトメトリーによる不規則抗体スクリーニングの可能性

丸橋 隆行¹⁾ 北爪 洋介²⁾ 田代 香奈³⁾ 長岡 出⁴⁾ 竹内紗耶香⁵⁾
 相馬真恵美⁶⁾ 須佐 梢¹⁾ 西本奈津美¹⁾ 石川怜依奈¹⁾ 岩原かなえ¹⁾
 横手 恵子⁷⁾ 入内島裕乃¹⁾⁸⁾ 関上 智美¹⁾⁸⁾ 横濱 章彦¹⁾

輸血前検査の不規則抗体スクリーニングの実施は、安全で迅速な輸血を行う上で極めて重要である。本研究では二次抗体に Anti-Human IgG PE を使用し、フローサイトメトリーにて解析することで臨床的意義のある IgG クラスの不規則抗体のみを検出する方法として開発した (FCM-SC)。結果はフローサイトメトリーによる検体 (Sample) と陰性対照 (Negative) との平均蛍光強度の比 (S/N 比) によって評価した。FCM-SC のカットオフ値は、カラム凝集法 (CAT) で陽性かつ、PEG-IAT 等による追加試験においても陽性であった最低値の S/N 比 1.7 以上を陽性値と設定した。抗 E や抗 S などの臨床的意義のある抗体では、CAT 陽性 95 例のうち FCM-SC で 83 例が陽性、12 例が陰性であった。その 12 例全例で FCM-SC と PEG-IAT による結果は陰性であり一致した。CAT にて抗 M と抗 Le^a が陽性の 29 例のうち FCM-SC が陰性であった 22 例については反応増強剤無添加—間接抗グロブリン試験による追加試験も陰性であり一致した。自己抗体、寒冷凝集など CAT にて反応の特異性を認めなかった 33 症例のうち、FCM-SC 陰性であった 9 例については還元剤処理後の血漿を用いた PEG-IAT による追加試験も陰性であり一致した。以上の結果より FCM-SC は臨床的意義のある IgG クラスの不規則抗体のみを検出する効果に優れており、不規則抗体スクリーニングとして活用できる可能性が示唆された。

キーワード：不規則抗体スクリーニング、フローサイトメトリー、CFSE

はじめに

赤血球輸血を行う前に、溶血性副作用を防止する目的で不規則抗体スクリーニングを実施することは極めて重要である。間接抗グロブリン試験 (Indirect anti globulin test : IAT) は臨床的意義のある不規則抗体を検出する上で最も信頼できる方法とされているため¹⁾、不規則抗体スクリーニングは IAT を含む方法で検査しなければならない。一方、酵素法はカラム凝集法 (Column Agglutination Technology : CAT) 導入施設の約 2/3 で併用されており²⁾、Rh 系抗体を感度良く検出できる反面、非特異反応や冷式抗体も数多く検出される欠点があり不規則抗体スクリーニングにおける効果は限定的とされている¹⁾。不規則抗体スクリーニングで抗体

特異性を推定した後に追加検査において不規則抗体を同定するため、不規則抗体スクリーニングに要求される条件としては高い感度と特異度を兼ね備えた方法が望ましいとされている³⁾。

不規則抗体スクリーニングは臨床の間では CAT、試験管法、マイクロプレート法で行われている¹⁾。今回我々は、従来の方法とは全く異なるフローサイトメトリーを用いた方法での不規則抗体スクリーニングを試みた。すなわち患者血漿と市販の不規則抗体スクリーニング赤血球試薬との一次免疫反応を Polyethylene glycol (PEG) で増強したのち、二次免疫反応に Anti-Human IgG phycoerythrin (PE) を採用、フローサイトメトリーにて IgG クラスの不規則抗体を特異的に捉える方法

1) 群馬大学医学部附属病院輸血部

2) 群馬中央病院臨床検査部

3) 桐生厚生総合病院中央検査部

4) 済生会前橋病院検査科

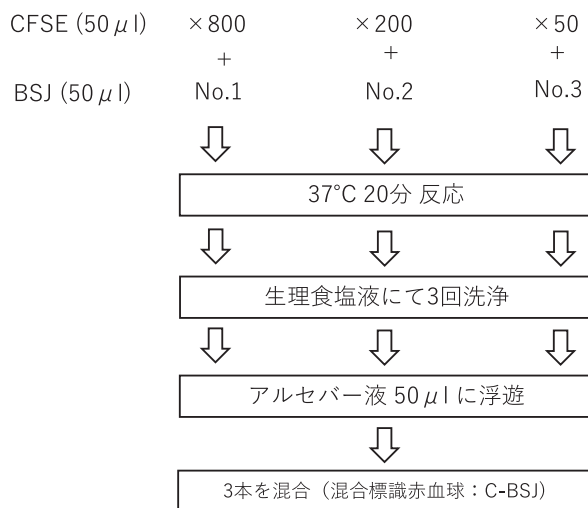
5) 高崎総合医療センター臨床検査科

6) 前橋赤十字病院臨床検査科部

7) 群馬大学医学部附属病院看護部

8) 群馬大学医学部生体統御内科学

〔受付日：2019年3月4日，受理日：2019年7月15日〕



CFSE : carboxyfluorescein diacetate

C-BSJ : Cocktail BioVue Screen J

図 1-1 C-BSJ の作成法

(Flow cytometry Irregular Antibody Screening : FCM-SC) である。CAT による不規則抗体スクリーニングにて陽性または陰性となった検体を用いて FCM-SC を実施し、CAT と比較をすることで FCM-SC の検査法としての有用性を評価したので報告する。

材料および方法

本研究は群馬大学医学部附属病院を中心とした 6 施設の多施設共同研究として行われた。当院 (2016-001) およびそれぞれの共同研究施設において臨床研究倫理審査の承認を受けている。

1. 材料

当院および共同研究施設で行われた CAT による不規則抗体スクリーニング及び同定検査において特異性が確定している陽性検体及び陰性検体を用いた。陽性検体は目標検体数 (180 例) に達した段階で各研究施設に出向き、冷凍保管しておいた検体をドライアイス入りの搬送バッグにて当院に搬送、冷凍保管した。検査データは個人情報の無い状態であることを確認後 USB メモリーに保存・移送、当院のパソコンにて管理した。陽性検体は、検体量不足や検体不良などの理由により研究が出来なかった検体を除いた 157 例とした。陰性検体は冷凍保管してあった当院の検体 220 例とした。検体はその日に測定する分のみ解凍し、以下の CAT (保管検体の反応性確認のため) 及び FCM-SC を行った。

2. CAT

全自動輸血検査システム Auto Vue Innova (オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス) による不規則抗体スクリーニング (酵素法及び IAT) を行い CAT

の結果値とした。スクリーニング赤血球は 3 本で 1 セットであるオーソバイオビュースクリーン J (BSJ : オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス) を用いた。尚、抗 E 陽性例については検体量の都合上、ホモ接合体赤血球 (BSJ RBC2 赤血球) のみ検討を行った。

3. FCM-SC

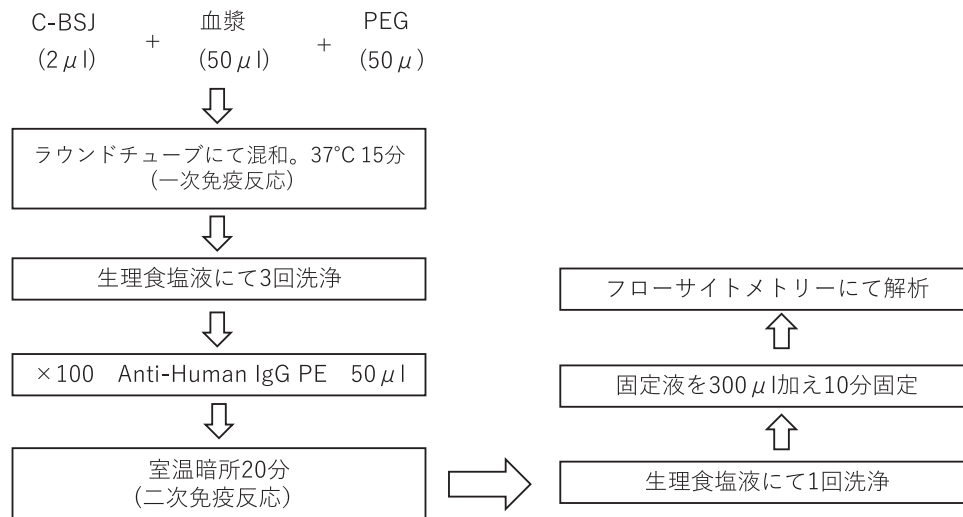
染色方法及び測定方法を図 1-1, 図 1-2 に示す。スクリーニング赤血球は CAT と同一ロットの BSJ を使用した。本研究で BSJ を標識するために用いた carboxyfluorescein diacetate (CFSE : Cayman Chemical) は励起光が 492nm であることから、フローサイトメトリーにて励起光がほぼ同じ波長の Fluorescein isothiocyanate (FITC) と同様の蛍光色素として測定できる特長がある。CFSE を 3 段階に希釈し 3 本の BSJ をそれぞれ染色した後に混和した (混合標識赤血球 : Cocktail-BSJ)。このことで BSJ を 3 集団 (RBC1~RBC3) に分離することが可能となる (図 2)。今回の研究では二次免疫反応で用いる標識抗体に Anti-Human IgG PE を使用していることから、検体中に IgG クラスの不規則抗体が存在した場合には CFSE と PE のダブルポジティブとして捉えることが可能となる。今回の研究では FCM-SC における二次抗体の平均蛍光強度 (MFI : mean fluorescence intensity), すなわち検体 (Sample) と陰性対照 (Negative) の PE MFI Median の比 (S/N 比) を求め、FCM-SC の結果値とした。

4. FCM-SC のカットオフ値の設定

最小値は陰性対照より検体の MFI が大きいことを示す S/N 比 1.1 とし、最大値は FCM の一般的なカットオフ値である S/N 比 2.0 とした。その間の値を示した検体について PEG-IAT 等の追加試験を行い、IgG クラスの不規則抗体陽性と判断された最低値をカットオフ値とした。

5. CAT と FCM-SC の比較

CAT は酵素法もしくは IAT においていずれか一方でも陽性を示した検体を陽性とした。本研究では I 群 : 臨床的意義があるとされている抗体 (95 例), II 群 : 抗 Le^a, 抗 M など (29 例)。これらの抗体は反応増強剤無添加一問接抗グロブリン試験 (60 分-IAT) が陽性の場合には臨床的意義があるとされている。III 群 : CAT-酵素法で非特異反応を示すもの、特異性の無い反応および自己抗体等の検体 (33 例), IV 群 : CAT 陰性であった検体 (220 例) に分け CAT と FCM-SC の結果を比較した。CAT と FCM-SC で結果が不一致だった検体についてはそれぞれ I 群, IV 群 : PEG-間接抗グロブリン試験 (PEG-IAT), II 群 : 60 分-IAT, III 群 : 還元剤処理 (0.05 M ジチオスレイトール 1 容と血漿 9 容を混和し 37°C 30 分処理) 血漿による PEG-IAT⁴⁾ により再検査を行い、臨床的意義の判断基準とした。



Anti-Human IgG PE: LS-C350654(LSBio)

固定液: Cell Fix(日本ベクトン・ディッキンソン)

フローサイトメトリー:FACS Canto II FACS Divaソフト
(日本ベクトン・ディッキンソン)

図 1-2 FCM-SC の測定法

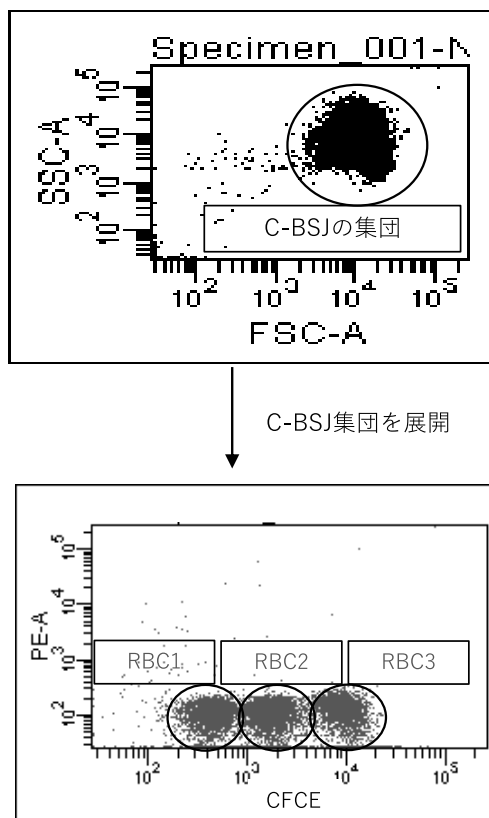


図 2 FCM-SC で測定した C-BSJ の 3 集団

結 果

1. FCM-SC (陰性対照及び特異性が確定している陽性症例)

図 3-1~図 3-4 で使用した C-BSJ は, RBC1 の表現型: D と Fy^b 抗原陽性, RBC2 の表現型: D と E 抗原陽性, RBC3 の表現型: Fy^b 抗原陽性であった. 図 3-1 に陰性対照, 図 3-2 に RBC1 と RBC2 陽性 (抗 D), 図 3-3 に RBC1 と RBC3 陽性 (抗 Fy^b), 図 3-4 に RBC2 のみ陽性 (抗 E) を示す. 陽性の 3 症例とも C-BSJ の表現型と一致していた.

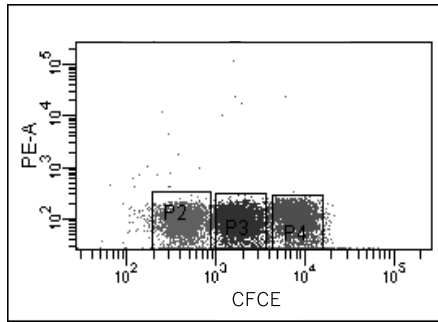
2. FCM-SC のカットオフ値の設定

表 1 に S/N 比 1.1~2.0 の結果を示す. PEG-IAT 陽性となった最低値は No. 79 の S/N 比 1.7 (抗 E) であった. S/N 比 1.7 未満で CAT 陽性となった症例についてはいずれも追加試験で陰性化していることから臨床的意義の無い IgM クラスの不規則抗体であることがわかる. これらのことから S/N 比 1.7 以上を陽性値と設定した.

3. CAT と FCM-SC の比較

I 群 95 例のうち, 両法とも陽性であったものは 83 例, CAT 陽性・FCM-SC 陰性であったのは 12 例であった(表 2-1). 不一致だった 12 例はいずれも CAT-酵素法のみ陽性であったが, PEG-IAT による追加試験では全て陰性であった(表 2-2). 表 2-3 に CAT-酵素法のみ陽性であった 27 例の詳細を示す.

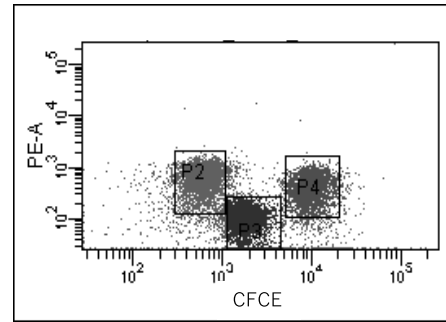
II 群 29 例のうち, 両法とも陽性であったものは 7 例, CAT 陽性・FCM-SC 陰性であったのは 22 例であ



Population	PE-A Median
P2	93
P3	89
P4	96

陰性対照

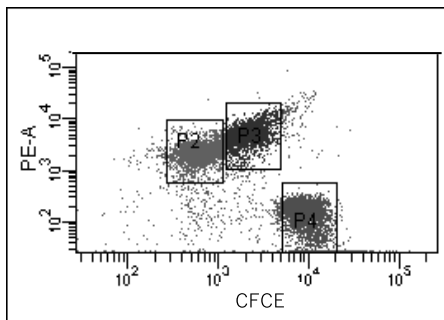
図 3-1 陰性対照



Population	PE-A Median
P2	681
P3	95
P4	404

- ① S/N=681/93=7.3
- ② S/N=86/89=0.97
- ③ S/N=404/96=4.2

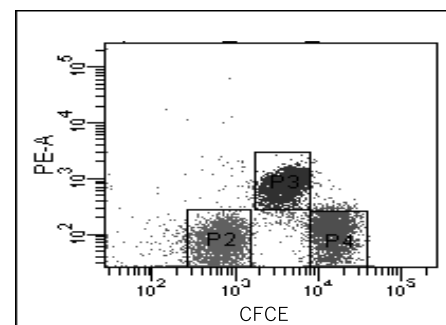
図 3-3 陽性例 (抗 Fy^b)



Population	PE-A Median
P2	3,017
P3	7,467
P4	112

- ① S/N=3017/93=32.4
- ② S/N=7467/89=83.9
- ③ S/N=112/96=1.2

図 3-2 陽性例 (抗 D)



Population	PE-A Median
P2	93
P3	674
P4	113

- ① S/N=93/93=1.0
- ② S/N=674/89=7.6
- ③ S/N=113/96=1.2

図 3-4 陽性例 (抗 E)

た(表 3-1). これらの 22 例について, 臨床的意義の有無を確認するために 60 分-IAT を実施したところすべてにおいて陰性であった (表 3-2).

III 群 33 例のうち, 両法とも陽性であったものは 18 例, CAT 陽性・FCM-SC 陰性であったのは 15 例であっ

表1 カットオフの設定

検体 No.		CAT		FCM-SC	追加検査
		酵素法	IAT	S/N	
117	抗 M	0	W+	1.1	60分-IAT (-)
118	抗 M	0	2+	1.1	60分-IAT (-)
148	該当抗体なし	1+	W+	1.1	還元剤で (-)
149	該当抗体なし	W+	W+	1.1	還元剤で (-)
111	抗 Le ^b	W+	2+	1.1	60分-IAT (-)
112	抗 Le ^b	1+	0	1.1	60分-IAT (-)
109	抗 Le ^a	2+	W+	1.1	60分-IAT (-)
91	抗 E	2+	0	1.1	PEG-IAT (-)
84	抗 C	W+	0	1.2	PEG-IAT (-)
150	該当抗体なし	W+	W+	1.2	還元剤で (-)
156	酵素非特異	2+	0	1.2	N.T.
106	抗 Le ^a	W+	W+	1.2	60分-IAT (-)
107	抗 Le ^a	W+	0	1.2	60分-IAT (-)
108	抗 Le ^a	W+	0	1.2	60分-IAT (-)
105	抗 Le ^a	1+	0	1.3	60分-IAT (-)
89	抗 E + 抗 c	4+	0	1.3	PEG-IAT (-)
92	抗 E	4+	0	1.3	PEG-IAT (-)
93	抗 E	2+	0	1.3	PEG-IAT (-)
144	寒冷凝集素	3+	0	1.3	60分-IAT (-)
85	抗 c	1+	0	1.4	PEG-IAT (-)
90	抗 E	1+	0	1.4	PEG-IAT (-)
94	抗 E	4+	0	1.4	PEG-IAT (-)
95	抗 E	4+	0	1.4	PEG-IAT (-)
124	抗 M	0	1+	1.4	60分-IAT (-)
145	寒冷凝集素	4+	3+	1.4	還元剤で (-)
153	酵素非特異	3+	0	1.5	N.T.
143	自己抗体	2+	2+	1.6	還元剤で (-)
66	抗 E	2+	0	1.7	PEG-IAT (-)
79	抗 E	3+	0	1.7	PEG-IAT (+)
11	抗 Di ^a	W+	W+	1.8	PEG-IAT (+)
14	抗 Fy ^b	0	W+	1.8	PEG-IAT (+)
97	抗 Le ^a	1+	0	1.8	PEG-IAT (-)
7	抗 C	2+	0	1.9	PEG-IAT (+)
9	抗 c	2+	0	1.9	PEG-IAT (+)
36	抗 E	W+	W+	1.9	PEG-IAT (+)
51	抗 E	3+	0	1.9	PEG-IAT (+)
125	抗 Mi	0	2+	1.9	PEG-IAT (+)
134	自己抗体	2+	W+	1.9	PEG-IAT (+)
138	DARA 投与	0	2+	1.9	PEG-IAT (+)
139	DARA 投与	0	2+	1.9	PEG-IAT (+)
18	抗 Fy ^b	0	W+	2.0	PEG-IAT (+)
42	抗 E	2+	W+	2.0	PEG-IAT (+)
80	抗 E	2+	0	2.0	PEG-IAT (+)

DARA : グラツムマブ

N.T. : Not Tested

表2-1 I群 : 臨床的意義のある抗体
CATとFCM-SCの比較

CAT		FCM-SC
酵素法 (+)	61	(+) 61
IAT (+)		
酵素法 (-)	7	(+) 7
IAT (+)		
酵素法 (+)	27	(+) 15
IAT (-)		(-) 12

た (表4-1). 明らかに酵素法非特異反応と判定された6例については追加試験を行っていないが, その他の9例について還元剤処理後血漿を用いたPEG-IAT^bの追加試験では全て陰性であったことから (表4-2), 寒冷凝集素や何らかのIgMクラスの不規則抗体, もしくは試薬に対する非特異反応であると判定されるため, いずれも臨床的意義はないものと考えられた.

IV群の結果を表5に示す. CATによる不規則抗体検査で陰性であった220例のうち8例がFCM-SC陽性であった. そのうち1例が抗Fy^b陽性であったが, この症

表 2-2 I 群：臨床的意義のある抗体
不一致検体の追加試験

検体 No.		CAT						FCM-SC			追加試験
		酵素			IAT			S/N			PEG-IAT
		①	②	③	①	②	③	①	②	③	
84	抗 C	W+	0	0	0	0	0	1.2	1.2	1.3	0
85	抗 c	0	1+	1+	0	0	0	1.0	1.4	1.2	0
86	抗 S	0	3+	2+	0	0	0	0.8	0.8	0.6	0
87	抗 S	0	1+	W+	0	0	0	0.8	0.7	0.3	0
88	抗 S	0	1+	0	0	0	0	0.8	0.8	0.9	0
89	抗 E+抗 c	N.T.	4+	N.T.	N.T.	0	N.T.	N.T.	1.3	N.T.	0
90	抗 E	N.T.	1+	N.T.	N.T.	0	N.T.	N.T.	1.4	N.T.	0
91	抗 E	N.T.	2+	N.T.	N.T.	0	N.T.	N.T.	1.1	N.T.	0
92	抗 E	N.T.	4+	N.T.	N.T.	0	N.T.	N.T.	1.3	N.T.	0
93	抗 E	N.T.	2+	N.T.	N.T.	0	N.T.	N.T.	1.3	N.T.	0
94	抗 E	N.T.	4+	N.T.	N.T.	0	N.T.	N.T.	1.4	N.T.	0
95	抗 E	N.T.	4+	N.T.	N.T.	0	N.T.	N.T.	1.4	N.T.	0

N.T. : Not Tested

表 2-3 I 群のうち CAT-酵素法のみ陽性の 27 例

検体 No.		CAT	FCM-SC		追加試験
		酵素	判定	S/N	PEG-IAT
7	抗 C	2+	(+)	1.9	1+
9	抗 c	2+	(+)	1.9	1+
27	抗 E+抗 c	1+	(+)	2.6	2+
29	抗 E+抗 c	2+	(+)	2.6	1+
34	抗 E	2+	(+)	6.2	1+
43	抗 E	2+	(+)	4.0	1+
44	抗 E	1+	(+)	4.4	1+
46	抗 E	2+	(+)	4.7	1+
51	抗 E	3+	(+)	1.9	1+
60	抗 E	2+	(+)	2.8	1+
66	抗 E	2+	(+)	1.7	w+
72	抗 E	1+	(+)	3.4	1+
74	抗 E	3+	(+)	5.8	2+
79	抗 E	3+	(+)	1.7	1+
80	抗 E	2+	(+)	2.0	1+
84	抗 C	W+	(-)	1.2	0
85	抗 c	1+	(-)	1.4	0
86	抗 S	3+	(-)	0.8	0
87	抗 S	1+	(-)	0.7	0
88	抗 S	1+	(-)	0.8	0
89	抗 E+抗 c	4+	(-)	1.3	0
90	抗 E	1+	(-)	1.4	0
91	抗 E	2+	(-)	1.1	0
92	抗 E	4+	(-)	1.3	0
93	抗 E	2+	(-)	1.3	0
94	抗 E	4+	(-)	1.4	0
95	抗 c	4+	(-)	1.4	0

例は元々, CAT-IAT が陽性の既知の抗体保有者だった。この時点では抗体価低下によって CAT-IAT 陰性であったが, FCM-SC では陽性と判定された。その他の 7 例については PEG-IAT の結果から IgG 型の自己抗体であると判定された。

表 3-1 II 群：60 分-IAT の反応性を確認する抗体
CAT と FCM-SC の比較

CAT		FCM-SC
酵素法 (+)	7	(+) 2
IAT (+)		(-) 5
酵素法 (-)	14	(+) 2
IAT (+)		(-) 12
酵素法 (+)	8	(+) 3
IAT (-)		(-) 5

考 察

赤血球輸血を行う前には IAT を含む不規則抗体スクリーニングを行い, 臨床的意義のある不規則抗体が検出された場合には対応する抗原を持たない血液を輸血する必要がある⁵⁾。その検査法としては, PEG や LISS を反応増強剤として使用した CAT, 試験管法, 固相マイクロプレート法 (総じて従来法) などの高感度な方法が推奨されている¹⁾。その中でも平成 29 年度の日臨技精度管理調査²⁾の結果から, CAT を導入している施設が 58.1% と最も割合が高く, 年々その傾向は増している。

不規則抗体検査法は臨床的意義のある不規則抗体を感度良く検出するとともに臨床的意義のない不規則抗体は検出しない方法が理想とされている³⁾。実際の不規則抗体検査では, 検査が陽性になった検体のうち 36% が非特異反応であったとの報告もあり⁶⁾, とりわけ CAT-酵素法において非特異反応が多いとされている⁶⁾⁻⁸⁾。不規則抗体検査における酵素法の意義について, 酵素法のみ陽性であっても初期の Rh 系不規則抗体に対しての感度が優れていることから不規則抗体検査に必要であ

表 3-2 II 群：60 分-IAT の反応性を確認する抗体
不一致検体の追加試験

検体 No.		CAT						FCM-SC			追加試験
		酵素			IAT			S/N			60 分-IAT
		①	②	③	①	②	③	①	②	③	
103	抗 Le ^a	2+	0	0	w+	0	0	0.9	0.9	1.0	0
104	抗 Le ^a	0	0	1+	0	0	w+	0.5	0.4	0.5	0
105	抗 Le ^a	1+	0	0	0	0	0	1.3	1.2	1.3	0
106	抗 Le ^a	w+	0	0	w+	0	0	1.2	0.9	0.9	0
107	抗 Le ^a	w+	0	0	0	0	0	1.2	0.8	0.4	0
108	抗 Le ^a	w+	0	0	0	0	0	1.2	1.1	1.1	0
109	抗 Le ^a	2+	0	0	w+	0	0	1.1	0.9	0.8	0
110	抗 Le ^a	w+	0	0	0	0	0	0.8	0.8	0.8	0
111	抗 Le ^b	0	w+	w+	0	2+	2+	1.1	1.0	0.9	0
112	抗 Le ^b	0	1+	1+	0	0	0	1.1	1.1	1.0	0
113	抗 M	0	0	0	0	w+	2+	0.8	0.8	0.9	0
114	抗 M	0	0	0	0	0	2+	0.9	0.9	0.8	0
115	抗 M	0	0	0	0	w+	2+	0.8	0.8	0.9	0
116	抗 M	0	0	0	0	0	2+	1.0	1.0	1.0	0
117	抗 M	0	0	0	0	0	w+	0.9	1.0	1.1	0
118	抗 M	0	0	0	0	w+	2+	0.8	0.9	1.1	0
119	抗 M	0	0	0	0	0	w+	0.9	0.9	1.0	0
120	抗 M	0	0	0	0	0	w+	0.9	0.9	0.9	0
121	抗 M	0	0	0	0	0	1+	0.9	0.9	0.9	0
122	抗 M	0	0	0	0	w+	2+	0.9	0.9	0.8	0
123	抗 M	0	0	0	0	0	3+	1.0	1.0	0.9	0
124	抗 M	0	0	0	1+	0	2+	1.4	0.5	1.4	0

表 4-1 III 群：意義の無い抗体
CAT と FCM-SC の比較

CAT		FCM-SC
酵素法 (+)	17	(+) 10
IAT (+)		(-) 7
酵素法 (-)	9	(+) 7
IAT (+)		(-) 2
酵素法 (+)	7	(+) 1
IAT (-)		(-) 6

るとされる報告がある一方^{9)~11)}、それらの抗体は臨床的意義が少ないことが考えられるため、適切な条件で IAT が行われていることを前提に省略可能であるとされる報告があり^{12)~14)}一定の見解は得られていない。酵素法のみで同定される不規則抗体の 90% が IgM クラスであるとの報告¹⁵⁾があることから IgM クラスが主体であるものの、一部には IgG クラスも混在していることが示唆されている。このことから酵素法は、欠点はあったとしても一部の IgG 抗体の検出には有用性があると考えらるべきであろう。いずれにしろ輸血に際しては、血管外溶血の原因となる臨床的に意義のある不規則抗体は IgG クラスに属しているとされているため¹⁶⁾、適切な輸血検査の絶対条件は IgG クラスの不規則抗体を確実に捉えることである。

従来法とは異なる原理に基づき不規則抗体の臨床的

意義の有無を調べる検査法として単球貪食試験が挙げられる¹⁷⁾。この検査法を用いて不規則抗体における酵素法の意義を検証した報告¹⁸⁾や、さらに発展させてフローサイトメトリーにて行った報告があり¹⁹⁾、生体内での IgG クラスの不規則抗体と単球が関連する血管外溶血との評価する方法として有用性が高いとされている。しかしながらいずれの方法も赤血球と結合した不規則抗体を単球が認識して貪食する反応であり、従来法とは原理が根本的に異なる。大橋らの報告¹⁸⁾では、PEG-IAT や CAT-IAT が陽性の群であっても単球貪食試験の 76% は陽性と判定されていないことから、IAT がもつ意義と同じ基準で比較することはできない。

本研究では、これら現在の不規則抗体検査の現状を鑑み、最も普及している CAT にて陽性または陰性と判定された検体を収集し FCM-SC を実施した。一般的に汎用されている市販の不規則抗体スクリーニング赤血球試薬を用い、PEG にて一次免疫反応を増強した後、二次抗体として Anti-Human IgG PE を用いることで、仮に IgM クラスの不規則抗体が存在していても反応せず、IgG クラスの不規則抗体のみを特異的に検出することを目指した。そして FCM-SC が臨床的意義のある不規則抗体のみを効率よく検出できるか評価することを最大の目的とした。

まずは FCM-SC のカットオフ値を設定することを試みた。一般的に、フローサイトメトリーを輸血検査に

表 4-2 III 群：意義の無い抗体
不一致検体の追加試験

検体 No.		CAT						FCM-SC			追加試験
		酵素			IAT			S/N			還元剤
		①	②	③	①	②	③	①	②	③	
143	自己抗体	1+	2+	1+	2+	2+	2+	1.5	1.4	1.6	0
144	寒冷凝集素	3+	3+	3+	1+	0	w+	1.0	1.3	1.0	0
145	寒冷凝集素	4+	4+	4+	4+	3+	3+	1.3	1.4	1.3	0
146	寒冷凝集素	0	0	0	3+	4+	0	0.8	0.7	0.7	0
147	該当抗体なし	0	0	0	w+	w+	w+	0.4	0.4	0.3	0
148	該当抗体なし	1+	1+	w+	w+	0	0	1.0	1.1	1.0	0
149	該当抗体なし	w+	w+	w+	0	w+	0	1.0	1.0	1.1	0
150	該当抗体なし	w+	w+	w+	w+	w+	w+	1.1	1.1	1.2	0
151	該当抗体なし	4+	4+	4+	3+	3+	3+	0.8	0.8	0.9	0
152	酵素法非特異	3+	3+	3+	0	0	0	0.9	1.0	0.8	N.T.
153	酵素法非特異	3+	3+	3+	0	0	0	1.5	1.5	1.3	N.T.
154	酵素法非特異	2+	2+	2+	0	0	0	0.9	1.0	0.9	N.T.
155	酵素法非特異	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0.9	1.0	0.9	N.T.
156	酵素法非特異	0	2+	2+	0	0	0	1.2	1.1	1.1	N.T.
157	酵素法非特異	w+	1+	w+	0	0	0	1.0	1.0	1.0	N.T.

N.T. : Not Tested

表 4-3 III 群：意義の無い抗体
一致検体の詳細

検体 No.		CAT						FCM-SC		
		酵素			クームス			S/N		
		①	②	③	①	②	③	①	②	③
125	抗 Mi	0	0	0	2+	0	0	1.9	1.2	1.1
126	抗 Mi	0	0	0	w+	0	0	34.7	0.9	1.1
127	抗 Mi	0	0	0	2+	0	0	7.2	0.9	1.1
128	抗 JMH	0	0	0	1+	w+	w+	4.0	3.3	2.9
129	自己抗体	1+	0	0	1+	0	0	10.2	24.2	19.7
130	自己抗体	4+	3+	4+	w+	w+	w+	3.4	5.7	5.2
131	自己抗体	1+	1+	1+	2+	2+	2+	5.5	5.6	4.8
132	自己抗体	2+	2+	2+	2+	2+	2+	23.8	85.4	50.1
133	自己抗体	1+	1+	1+	1+	w+	w+	2.6	2.7	2.3
134	自己抗体	3+	2+	2+	w+	w+	w+	1.7	1.9	1.6
135	自己抗体	4+	1+	1+	0	0	0	2.1	2.0	2.5
136	自己抗体	4+	3+	4+	1+	w+	w+	1.9	1.7	2.2
137	自己抗体	1+	0	1+	w+	0	w+	5.4	1.5	4.7
138	DARA 投与	0	0	0	2+	2+	2+	1.8	1.9	1.2
139	DARA 投与	0	0	0	2+	2+	2+	1.8	1.9	1.3
140	DARA 投与	0	0	0	2+	2+	2+	2.1	2.2	2.1
141	PEG 非特異	4+	4+	3+	w+	w+	w+	4.3	5.7	2.1
142	抗リン脂質抗体	w+	w+	w+	w+	w+	w+	3.9	3.3	5.9

DARA : グラツムマブ

応用した報告¹⁸⁾²⁰⁾ではカットオフ値を S/N 比 2.0 に設定するケースが多いが、必ずしも根拠は示されていない。本研究では表 1 の検討から S/N 比 1.7 以上を陽性値と設定して I 群～IV 群を評価した。

PEG-IAT は他の反応増強剤を用いた IAT より感度が高いとされているため²¹⁾、I 群の追加検査は PEG-IAT を採用し臨床的意義の判断基準とした。CAT 陽性全体 95 例のうち、CAT-酵素法のみ陽性の 27 例についての

結果では(表 2-3)、FCM-SC 及び PEG-IAT の結果が陽性と陰性が混在しているが、両検査法の結果は一致したことから FCM-SC は酵素法を含まない方法であっても、臨床的意義のある不規則抗体を効率よく検出できると考えられる。以前より CAT-酵素法のみ陽性の不規則抗体のうち PEG-IAT を実施すると陽性と判定される症例は報告されているが¹⁰⁾²²⁾、本研究でも同様の結果となった。

表5 IV群：CAT陰性220例中FCM-SCがS/N1.7以上の追加試験

FCM-SC			追加試験
S/N			PEG-IAT
①	②	③	
2.5	2.0	1.3	陽性だが特異性なし
2.0	2.4	1.3	陽性だが特異性なし
1.6	1.7	1.3	陽性だが特異性なし
0.9	1.9	1.0	陽性だが特異性なし
1.7	2.3	1.5	抗Fy ^b
1.6	1.8	1.4	陽性だが特異性なし
2.8	4.3	2.2	陽性だが特異性なし
2.1	2.3	2.3	陽性だが特異性なし

II群,特に抗Mについて,大半はIgMクラスの自然抗体で臨床的意義が少ないとされている²³⁾。しかし,IAT陽性の場合には臨床的意義があるとされており,とりわけIgGクラスの抗Mは重篤な胎児新生児溶血性疾患や造血抑制の原因となるときがある²³⁾。抗Le^aについても同様で,自然抗体が多いとされているが,IgGクラスの抗Le^aでの溶血性副作用の報告もある²⁴⁾。これらの不規則抗体の臨床的意義を鑑別する方法として60分-IATが有用とされているため²⁵⁾,本研究でも追加試験として採用し臨床的意義の判断基準とした。その結果,今回検討した29例のうち,CAT,FCM-SCともに陽性であった検体は7例のみであった(表3-1)。結果が不一致の22例はCAT陽性・FCM-SC陰性であったがそのすべてが60分-IATも陰性で(表3-2),臨床的意義はなかった。

III群は試薬に対する非特異反応,自己抗体,同定を行っても特異性が見当たらずに精査の結果,該当抗体無しとして報告した症例である。不規則抗体スクリーニングにおいて不規則抗体陽性と判定された2.7%のうち,臨床的意義のある不規則抗体は0.95%との報告があり²⁶⁾,特異性のない反応が多く検出されている現状がある。これらの反応は多岐にわたっており厳密にそれらの原因を特定することは困難で,臨床的意義を見極めるために多くの労力とコストがかかっていることは事実である。そのため本研究ではCAT陽性・FCM-SC陰性の不一致15例のうち(表4-1),酵素法非特異反応が明らかであった6例を除いた9例について還元剤処理後血漿にてPEG-IATを行い⁴⁾,IgGクラスの不規則抗体か否かの鑑別を行うことで臨床的意義の有無を判断することにした。その結果,この9例についてはIgGクラスの不規則抗体が否定されており(表4-2),臨床的意義が無い抗体であった。一方,表4-3にCAT・FCM-SCとも陽性の結果を示す。臨床的意義が無いとされている抗Mi,抗JMHの他にIgGクラスの自己抗体と判定された抗体などが含まれている。FCM-SCが陽性で

あるならばIgGクラスの抗体の可能性を考慮し,同定検査等の精査を行った上で臨床的意義を判断する必要があることが示唆された。

その他,CATにて陰性と判定された220症例についてFCM-SCを実施したところ,8例でFCM-SCが陽性であった(表5)。特異性を認めなかった7例は表4-3と同様にIgGクラスの自己抗体の可能性が高いと考えられる。また,抗Fy^b陽性の1例は既知の症例であり,CATで時に陽性,時に陰性の,検出限界感度の症例である。一般的にLISS-IATよりもPEG-IATの感度が優れているとされているため²⁷⁾,PEGにて増強を行っている本法はIgGクラスの不規則抗体に対してCATと同等以上の感度が得られる可能性が示唆された。

本研究のコストについても検討した。当院の検体数での試算ではCAT法では約1,400円だが,FCM-SCでは約450円と1/3程度である。これは高価であるカラムを使わないこと,C-BRCJの使用量が1テストあたり2μlであることによる効果大きい。さらに,IgGクラスの不規則抗体を選択的に検出する効果に優れているため,従来法において臨床的意義の有無を調べる目的で行われていた精査に費やしていた多くのコストと労力の削減効果は計り知れない。

一方,FCM-SCの短所はそもそもFCMが必要であること,用手法による操作が必要であること,緊急時には対応しにくい,などが挙げられる。用手法に関して,分注操作については汎用の分注装置を,測定操作についてはFCMにオートローダーを採用するなどして対応が可能である。それらの条件を整えば緊急検体以外の大量検体の処理には適性があると考えられるものの,現時点では研究的な要素が強い方法であり引き続きの検討が必要だと考えている。

まとめ

CAT検査後の検体にてFCM-SCを実施し,FCM-SCの不規則抗体スクリーニングとしての有用性を評価した。その結果,臨床的に意義のあるIgGクラスの不規則抗体を高い特異度で捉える一方,IgMクラスと考えられる不規則抗体や非特異反応など,臨床的意義の無い症例については陰性と判定された。費用対効果のみならず追加検査に費やす労力の削減効果にも優れており,FCM-SCは不規則抗体スクリーニングとして活用できる可能性が示唆された。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

本研究は平成30年日本輸血・細胞治療学会臨床研究推進事業の支援を受けて行われた。

文 献

- 1) 日本輸血・細胞治療学会：赤血球型検査(赤血球系検査)ガイドライン(改訂2版), 2016.
- 2) 日本臨床衛生検査技師会：平成29年度「日臨技臨床検査精度管理調査報告書」輸血検査部門, 2018.
- 3) 登尾一平, 吉田剛士, 久保田喜子, 他：不規則抗体スクリーニング検査の試薬(0.8%セルスクリーンJ)検討. 日臨技九州支部医学検査学会誌, 50: 61, 2015.
- 4) 西本奈津美, 丸橋隆行, 須佐 梢, 他：IgM処理法の比較と各溶液の特長の考察. 日本医学検査学会抄録集, 66: 422, 2017.
- 5) 厚生労働省医薬食品局血液対策課：輸血療法の実施に関する指針(改訂版), 2014.
- 6) 三島由祐子, 會田砂良, 名倉 豊, 他：不規則抗体の検査法の比較検討. 医学検査, 62: 661—665, 2013.
- 7) 片井明子, 横山愛弓, 藤田江美, 他：酵素法のみで検出される抗Leaの臨床的意義についての検討. 日本輸血細胞治療学会誌, 64: 398, 2018.
- 8) 正木杏奈, 田部裕二, 岩切文子, 他：不規則抗体スクリーニング検査(酵素法)陽性時の運用方法変更による効果検証. 日本輸血細胞治療学会誌, 63: 465, 2017.
- 9) 岸野光司：当院の不規則抗体検査における酵素法の位置づけ. 日本輸血細胞治療学会誌, 59: 243, 2013.
- 10) 仁田亜以乃, 長谷川浩子, 田口茉莉奈, 他：不規則抗体スクリーニング検査における酵素法について. 日臨技会誌, 126: 53, 2016.
- 11) 海老田ゆみえ, 浦崎芳正, 小林洋子, 他：不規則抗体検査酵素法の検討 フィシン2段法のみ陽性抗E保有患者の輸血後追跡検査から. 日本輸血細胞治療学会誌, 62: 362, 2016.
- 12) 祖父江晃基, 奥田 誠, 町田 保, 他：不規則抗体検査における酵素法廃止前後の比較検討. 日本輸血細胞治療学会誌, 60: 415, 2014.
- 13) 前沢由美子, 杉本達哉, 武井美恵子, 他：酵素法のみで検出される不規則抗体保有者における対応抗原陽性赤血球輸血の解析. 日本輸血細胞治療学会誌, 63: 473, 2017.
- 14) Issitt PD, Combs MR, Bredehoeft SJ, et al: Lack of clinical significance of "enzyme-only" red cell alloantibodies. *Transfusion*, 33: 284—293, 1993.
- 15) 水村真也, 戸田麻衣子, 吉井真司, 他：ゲルカラム凝集法での酵素法のみ陽性検体の検討. 日本輸血細胞治療学会誌, 53: 250, 2007.
- 16) Poole J, Daniels G: Blood Group Antibodies and Their Significance in Transfusion Medicine. *Transfusion Medicine Reviews*, 21: 58—71, 2007.
- 17) Arndt PA, Garratty G: A retrospective analysis of the value of monocyte monolayer assay results for predicting the clinical significance of blood group alloantibodies. *Transfusion*, 44: 1273—1281, 2004.
- 18) 大橋 恒, 石丸 健, 天満智佳, 他：不規則抗体スクリーニングにおける酵素法の意義. 日本輸血細胞治療学会誌, 56: 709—715, 2010.
- 19) Ito S, Hishinuma T, Ogiyama Y, et al: Evaluation of erythrocyte autoantibodies with flowcytometric phagocytosis assay. *International Journal of Blood Transfusion and Immunohematology*, 8: 1—7, 2018.
- 20) 小川公代, 永濱景子, 志賀達哉, 他：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. 日本輸血細胞治療学会誌, 64: 66—71, 2018.
- 21) 坂本 大：臨床検査Q&A PEG法による不規則抗体スクリーニング(Q&A). *Medical Technology*, 39: 304—305, 2011.
- 22) 志方えりさ, 佐々木貴代子, 平塚ひとみ, 他：当院における不規則抗体スクリーニングで検出された酵素法陽性LISS-IAT陰性例の頻度と検証. *臨床病理*, 65: 185, 2017.
- 23) 前田平生, 大戸 斉, 岡崎 仁, 他：輸血学. 中外医学社, 東京, 2018, 165.
- 24) Höglund P, Rosengren-Lindquist R, Wikman AT: A severe haemolytic transfusion reaction caused by anti-Le^a active at 37°C. *Blood Transfus*, 11: 456—459, 2013.
- 25) 日本輸血・細胞治療学会輸血検査技術講習委員会：輸血のための検査マニュアル Ver1.3.1.
- 26) 櫻木美基子, 清川知子, 細川美香, 他：輸血後不規則抗体陽性化症例の臨床経過についての検討. 日本輸血細胞治療学会誌, 59: 579—585, 2013.
- 27) Shirey RS, Boyd JS, Ness PM, et al: Polyethyleneglycol versus low-ionic-strength solution in pretransfusion testing: a blinded comparison study. *Transfusion*, 34: 368—370, 1994.

POSSIBLE METHOD FOR IRREGULAR ANTIBODY SCREENING BY FLOW CYTOMETRY

*Takayuki Maruhashi¹⁾, Yousuke Kitazume²⁾, Kana Tashiro³⁾, Izuru Nagaoka⁴⁾, Sayaka Takeuchi⁵⁾,
Maemi Souma⁶⁾, Kozue Susa¹⁾, Natsumi Nishimoto¹⁾, Reina Ishikawa¹⁾, Kanae Iwahara¹⁾, Keiko Yokote⁷⁾,
Hirono Iriuchishima¹⁾⁸⁾, Tomomi Sekigami¹⁾⁸⁾ and Akihiko Yokohama¹⁾*

¹⁾Division of Blood Transfusion Service, Gunma University Hospital, Faculty of Medicine, Gunma University

²⁾Department of Clinical Laboratory, Japan Community Health Care Organization Gunma Chuo Hospital

³⁾Department of Central Clinical Laboratory, Kiryu Kosei General Hospital

⁴⁾Department of Laboratory Medicine, Saiseikai Maebashi Hospital

⁵⁾Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Takasaki General Medical Center

⁶⁾Japanese Red Cross Society, Department of Clinical Laboratory, Japanese Red Cross Maebashi Hospital

⁷⁾Division of Nursing, Gunma University Hospital

⁸⁾Department of Hematology Science, Gunma University Graduate School of Medicine

Abstract:

It is very important to perform irregular antibody screening to ensure safe and efficient red blood cell transfusion. In this study, we developed a new method to detect IgG class irregular antibodies by flow cytometry using anti-human IgG as a secondary antibody (Flow Cytometry Irregular Antibody Screening: FCM-SC). The mean fluorescence intensity ratio of the patient sample to negative sample (S/N) was estimated. The result was considered positive if S/N was greater than 1.7. For clinically significant antibodies like anti-E and anti-S, 12 out of 95 cases with Column Agglutination Technology (CAT) positive results were FCM-SC negative, and additional testing by PEG-IAT confirmed the negative results. 22 out of 29 cases that were anti-M and anti-Le^a antibody positive by CAT were FCM-SC negative, and additional testing by IAT without enhancement media revealed that all cases were negative. 9 out of 33 cases that did not show reaction specificity by CAT, such as by autoantibody and cold agglutination, were FCM-SC negative, and additional testing by PEG-IAT using plasma that had been treated with a reducing agent also showed negative results. These results suggest that FCM-SC is a useful method for detecting IgG class irregular antibodies and may be suitable for antibody screening.

Keywords:

Irregular antibody, Flow cytometry, CFSE