

## 市販の緩衝液を利用したグリシン・塩酸/EDTA による自己抗体検査法の評価

丸橋 隆行<sup>1)</sup> 岩原かなえ<sup>1)</sup> 須佐 梢<sup>1)</sup> 西本奈津美<sup>1)</sup> 石川怜依奈<sup>1)</sup>  
 関上 智美<sup>1)2)</sup> 横濱 章彦<sup>1)</sup>

自己抗体陽性患者の輸血検査において血漿中の自己抗体の特異性や同種抗体の有無を確認することは極めて重要である。その際に必要となるのが赤血球に結合している自己抗体を除去することであるが、解離試薬としてクロロキン（ガンマクイン：イムコア）や ZZAP（イムコア W.A.R.M.：イムコア）などが市販されている（従来法）。一方、成書にはグリシン・塩酸/EDTA 法が紹介されているが<sup>1)</sup>、煩雑な自家調整が必要である。我々は、この解離法を市販されている類似の緩衝液を用いて行い（本法）、自己抗体検査法としての可能性を検討した。同意が得られた自己抗体陽性の3症例について検討を行った。この3検体を用いて従来法と本法を実施し、解離処理前後の直接抗グロブリン試験、および自己抗体を解離した後の赤血球を用いた同種抗体の検索の結果を比較した。その結果、直接抗グロブリン試験では従来法と同程度に減弱、同種抗体の検索においても従来法と同様に同種抗体を否定することが可能であった。また、処理に要する時間も極めて短時間であった。以上のことから本法は自己抗体検査法として有用である可能性がある。

キーワード：自己抗体, グリシン・塩酸/EDTA 法

## はじめに

自己抗体陽性患者への輸血において、血漿中の自己抗体の特異性や同種抗体の有無を確認することは適合血を選択する上で極めて重要である<sup>1)</sup>。同種抗体の有無を確認するためには自己赤血球を用いて自己抗体を吸着除去する必要があるが、そのためにはまず、自己赤血球に結合している IgG 型自己抗体を解離し（解離法）、自己抗体の結合部位をなるべく多くしなければならぬ。この解離法にはクロロキン（ガンマクイン：イムコア）や ZZAP（イムコア W.A.R.M.：イムコア）など、市販の解離液（従来法）で行うことも可能であるが、成書ではグリシン・塩酸/EDTA 解離法が紹介されている<sup>1)2)</sup>。しかしこの試薬は複雑な自家調整が要求されているため、日常業務で導入することは困難である。そこで今回、我々は、市販されている類似の緩衝液を用いてこの解離法を行（本法）、自己抗体検査法としての可能性を検討したので報告する。尚、本研究は同意の得られた3名の自己抗体陽性患者の血液を用いて行った。

## 試薬と処理法

①0.1mol/l グリシン・塩酸緩衝液 pH2.2 (FUJI

FILM)：原液を使用。冷蔵保管。

②10% EDTA：EDTA・2Na (FUJI FILM) 2g を蒸留水 20ml で溶解、使用。室温保管。

③1M-Tris-HCl pH9.0(NIPPON GENE)：原液を使用。冷蔵保管。

用いる赤血球は生理食塩液にて3回洗浄する。

赤血球とそれぞれの試薬の容量バランスを決定する必要がある。そのため自己抗体陽性赤血球と①を混合し、混合容量毎の赤血球表面 IgG 量(FITC-Median)の変化をフローサイトメトリー(FACSLytic™フローサートメーター：日本 BD)にて測定した(図1)。赤血球表面 IgG の除去効果は20倍の容量ではほぼ最大となることから20容と決定した。②の容量についてはガンマ EGA キットを参考に5容とした。③の容量については pH 計(LAQUA TWIN：HORIBA)を用いて中性(pH6.5~7.5)になる容量を考慮し、2容とした。

以上の根拠に基づき、処理は以下の割合で行うこととした。

赤血球：①：②：③=1容：20容：5容：2容

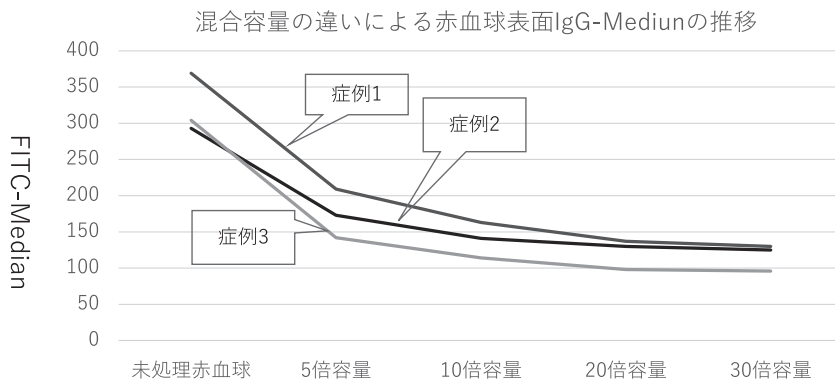
以下、赤血球を500μl 処理する場合の処理法を示す

1. ①10ml と②2.5ml を15ml のコニカルチューブに混合する。

1) 群馬大学医学部附属病院輸血部

2) 群馬大学医学部生体統御内科学

〔受付日：2020年6月16日、受理日：2020年9月1日〕



混合比		未処理赤血球	5倍容量	10倍容量	20倍容量	30倍容量
混合比	赤血球		1	1	1	1
	グリシン塩酸		5	10	20	30
	EDTA-2Na		1.25	2.5	5	7.5
	Tris-Hcl		0.5	1	2	3
DAT	症例1	3+	2+	2+	1+	1+
	症例2	3+	2+	1+	1+	W+
	症例3	2+	2+	1+	0	0

図1 自己抗体陽性赤血球に0.1mol/lグリシン・塩酸緩衝液を、容量を変えて加え解離処理を行った。処理後赤血球表面IgG量をFITC標識anti-Human IgG (BETHYL)を用い、FACSLyric™フローサートメーター(日本BD)で解析した。同時に処理後赤血球の直接抗グロブリン試験も行った。

表1-1 自己抗体陽性患者に対する各種解離法後のDAT強度

	症例1	症例2	症例3
未処理	3+	3+	2+
ガンマ EGA キット	0	0	0
イムコア W.A.R.M.	1+	2+	0
ガンマクイン	1+	1+	0
本法	w+	1+	0

表1-2 解離後赤血球を用いたLISS吸着法による同種抗体検索

		RBC1	RBC2	RBC3
症例1	血漿	4+	4+	4+
	イムコア W.A.R.M.	0	0	0
	ガンマクイン	w+	w+	w+
	本法	0	0	0
症例2	血漿	4+	4+	4+
	イムコア W.A.R.M.	w+	w+	w+
	ガンマクイン	w+	w+	w+
	本法	w+	w+	w+
症例3	血漿	3+	3+	2+
	イムコア W.A.R.M.	1+	2+	0
	ガンマクイン	1+	2+	0
	本法	1+	2+	0

症例1, 2は汎反応性自己抗体のみ  
 症例3は汎反応性自己抗体+自己抗D  
 RBC1: No.1スクリーニング赤血球  
 RBC2: No.2スクリーニング赤血球  
 RBC3: No.3スクリーニング赤血球

- この混合液に赤血球 500μl を加え、良く混和する。(1~2 分間、室温で反応)
- ③1.0ml を加えて良く混和、中性にする。
- 2,500rpm (1,000~1,200G) 2分 遠心し、上清を廃棄する。
- 赤血球を生理食塩液にて 2 回洗浄する (2,500rpm (1,000~1,200G) 2 分)
- 吸着法を行い、血漿中の同種抗体の検索を行う。

3 症例について各種解離法後の直接抗グロブリン試験 (direct anti globulin test : DAT) 及び、それぞれの自己赤血球を用いた自己抗体吸着法による同種抗体の検索 (同種抗体検索) を行った。

結 果

表 1-1 に各種解離法後の DAT 強度を示す。最も解離効果が高かったのはガンマ EGA キットであり DAT が陰性化した。一方、本法は陰性化しなかったものの、

従来法と同程度に減弱したことから自己抗体解離効果はそれらと同程度と認められる。また、表 1-2 には解離後の自己赤血球を用いた、同種抗体検索の結果である。その結果、本法は従来法での同種抗体検索と同様の結果となり、同種抗体の有無を評価できるようになった。

考 察

抗原抗体反応は酸性下におくことで平衡状態がくず

れ、赤血球に結合した抗体が解離することが知られている<sup>2)</sup>。Rekvigらはグリシン・塩酸を用いた解離試験を行い、従来の解離法と比較して簡単かつ迅速であったと報告している<sup>3)</sup>。またLouieらはEDTAを追加した酸解離法を行い、クロロキンやZZAPを用いた方法と同等の効果を得られつつ、抗原性には影響がなかったと報告している<sup>4)</sup>。さらにPeterらはLouieらの方法をキット化して日常検査に活用しこの方法の解離試験としての有用性を高く評価している<sup>5)</sup>。

各解離法の処理時間はイムコア W.A.R.M.は30分、ガンマクインは120分、本法は2分と、極めて短時間で処理が可能である。本法は成書に記載されているグリシン・塩酸/EDTA解離法で要求されている複雑な自家調整が不要であること、加えて市販の緩衝液であるため保存安定性は自家製よりも優れていることが期待できる、などが最大の利点である。本法は、従来法と同等の自己抗体解離効果を認めつつ短時間で同種抗体の

検索が可能であったことから、自己抗体検査法として有用である可能性がある。

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) 池田和博：JAMT 技術教本シリーズ 輸血・移植検査技術教本，丸善出版，東京，2020。
- 2) 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。
- 3) Rekvig OP, Hannestad K: Acid elution of blood group antibodies from intact erythrocytes. *Vox Sang*, 33: 280—285, 1977.
- 4) Louie JE, Jiang AF, Zaroulis CG: Preparation of intact antibody-free red cells in autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion*, 26: 550, 1986.
- 5) Peter CP: Use of modified acid/EDTA elution technique. *Immunohematology*, 7: 46—47, 1991.

## EVALUATION OF AN AUTOANTIBODY TEST WITH A GLYCINE ACID/EDTA ELUTION TECHNIQUE USING COMMERCIAL BUFFER

*Takayuki Maruhashi<sup>1)</sup>, Kanae Iwahara<sup>1)</sup>, Kozue Susa<sup>1)</sup>, Natsumi Nishimoto<sup>1)</sup>, Reina Ishikawa<sup>1)</sup>, Tomomi Sekigami<sup>1)2)</sup> and Akihiko Yokohama<sup>1)</sup>*

<sup>1)</sup>Division of Blood Transfusion Service, Gunma University Hospital, Faculty of Medicine, Gunma University

<sup>2)</sup>Department of Hematology, Gunma University Graduate School of Medicine

### Keywords:

Autoantibody, Glycine acid/EDTA elution technique