

抗 A/B 抗体価測定法の自動化に向けての現状と展望

松野 貴洋^{1,2}・松浦 秀哲^{1,2}・赤塚 美樹^{1,3}・及川 彰太^{1,2}
荒川 章子^{1,2}・杉浦 縁^{1,2}・恵美 宣彦^{1,3}

(¹藤田医科大学病院・輸血部)

(²藤田医科大学病院・臨床検査部)

(³藤田医科大学医学部・血液内科学教室)

1. はじめに

ABO 血液型不適合臓器移植ではレシピエントが高力価の抗 A/B を保有する場合腎移植成績に影響するため、二重膜濾過血漿交換や単純血漿交換により抗体除去が行われている。また、移植後に抗体価が再上昇した際にも、同様の処置が施行される。他方、血液型不適合妊娠においても、新生児溶血性疾患の原因となる不規則抗体を保有する母親に対しては、出産まで定期的に抗体価のモニタリングが行われる。母親の抗体価が高値の場合には血漿交換などの治療を行う場合がある。このように抗体価検査は治療を施行するかの判断に用いられる重要な検査項目のひとつである。

2. 腎移植

ABO 血液型不適合腎移植は避けることが一般的であったが、1985 年に血液型抗体 (抗 A/B) を血漿交換で除去後に腎移植を行い、同時に摘脾することで良好な成績が得られたとの報告がある³。それ以降、我が国でも血液型不適合腎移植が行われるようになった。さらに現在では抗体産生を効果的に抑制する事が可能な分子標的薬である rituximab の術前投与と血漿交換を行うことで、摘脾を行わない ABO 血液型不適合移植が行われるようになった⁴。また rituximab が投与された ABO 不適合腎移植と ABO 適合腎移植には生着率に差はなく、急性抗体関連型拒絶反応の発症率にも差は認められなかった⁵。

2-1. 腎移植数の推移

透析患者数の増加に伴い腎移植数も年々増加傾向であり、なかでも生体腎移植数が著しく増加している。その理由として献腎移植数が少ないこと、それに伴い夫婦間などの非血縁間の移植が多いことが考えられる。

近年の国内腎移植のうち生体腎移植がほとんどを占めている^{6,7}。

このように、生体腎移植をはじめ移植件数が増加する背景があり、抗体価検査の依頼数も増加していくことが予想される。そこで、より精度の高い検査結果を提出することが検査部門には求められる。

3. 抗体価検査方法

現在、抗体価検査法は、試験管を用いて検査者が患者サンプルの希釈から結果の判定までを手で行う試験管法 (Tube test, 以下 TT) で行われている。その測定方法は、被検血漿を生理食塩液で 2 倍連続希釈し、対応する抗原陽性赤血球試薬と混和後に、反応増強剤無添加の条件下で間接抗グロブリン試験 (indirect antiglobulin test, 以下 IAT) を行う。その判定は、赤血球と抗体との反応凝集強度が 1+ 以上の凝集を示した血漿の最大希釈倍率の逆数を抗体価としている (図 1)。

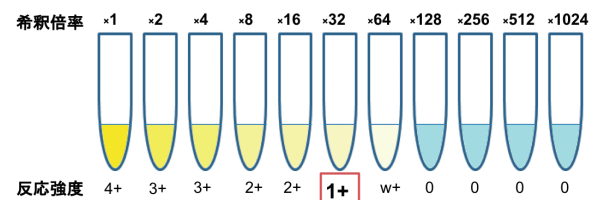


図1 抗体価検査法の実施例

図1の場合、抗体価は反応凝集強度 1+ を示す 32 倍となる。

IAT とは IgG 抗体を検出する測定法の一つである。生体内または生理食塩液中では赤血球同士の凝集を防ぐために赤血球表面にゼータ電位を生じ、赤血球同士が一定の距離を保っている。このため臨床的意義のある IgG 型抗体単独では赤血球感作のみにとどまり、赤

血球凝集に至らない。そこで、感作した IgG 型抗体を検出するために、感作抗体の Fc 部分に特異的な抗ヒト IgG 抗体を反応させることで、IgG 型抗体単独では得られなかった赤血球同士の架橋が生まれ、それにより目視にて赤血球凝集の有無を判別できるようになる。こうした測定法を IAT といい、抗体と赤血球との感作には 37°C の反応温度と、1 時間の反応時間を必要とする。

しかし、生体内の抗体には IgG 以外に IgM クラスが存在し、それぞれ反応至適温度が異なる。臨床的意義の高い IgG を検出するためには 37°C で反応させるが、赤血球を直接凝集可能な IgM の影響を少なからず受けてしまうため IgG のみの反応を捉えることができない。そこで IgM の測り込みを抑えるため Dithiothreitol (以下 DTT) や 2-メルカプトエタノール (以下 2-ME) などのスルフヒドリル試薬を用い、IgM 分子のジスフィド結合 (S-S 結合) を還元作用により切断することで、IgM 型抗体を失活させる。Okuno⁹らは、0.005 ~ 0.01M, pH7.0 ~ 8.0 の DTT 溶液を使用し、37°C で反応させることで IgM を不活化することができる^{10, 11}と報告している。この処理により血漿 (血清) 中の抗体が IgM 型か IgG 型かを鑑別することができる。

4. 抗体価検査の問題点

輸血検査は前述したとおり、測定者の用手によってサンプル調整から、結果判定まで一貫して行われる。希釈調整や赤血球凝集反応の目視判定は、熟練した技術が求められる。特に凝集判定は個人差が出やすいため、定期的な検査室内での目合わせが必要となる。結果判定は、目視によって行われるため測定者の主観に左右されやすく、客観的な結果判定が難しい。これが測定者間差や施設間差の原因につながる。抗体価検査も例外ではない。そこで Kobayashi¹²らは、国内のいくつかの施設で試験管法によって測定された同じ血液サンプルからの抗 A/B 抗体価の差異を調査した。施設間の差異は、凝集結果判定時の再現性が低いため、IgM が 1 : 8 ~ 1 : 32, IgG が 1 : 16 ~ 1 : 256 と誤差があることが明らかになった。したがって、彼らは日本における抗体価検査の標準化した測定法が必要であると結論づけた。

5. 輸血検査領域における自動化

臨床検査領域において自動化がますます進んでいく中で、その全行程が用手法である輸血検査の領域では自動化が行いにくい領域であった。そんな中、日本においても 1996 年以降にカラム凝集法やマイクロプレート法などの試験管法とは全く異なる新技術が導入さ

れ、輸血検査領域での自動化が進められた。これにより検査室の省力化と検査拘束時間縮小による生産性の向上、定量化による測定者間差・施設間差の縮小につながり、多くの施設で輸血検査の自動分析装置が使用されるようになった¹³。

5-1. カラム凝集法 (column agglutination technology : CAT)

オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス社製の Bio Vue システムについて概説する。本システムは、マイクロチューブの形状を持った 6 つのカラムを含むプラスチックカセットで構成されている。カラム内にはフィルターの役割をする直径 80 ~ 100 μ の均質な球状のガラスビーズ及び試薬が予め充填されている。抗原抗体反応により形成された凝集塊は遠心操作の際、このガラスビーズのフィルター効果により捕らえられ陽性像として検出される。他方、非凝集赤血球はビーズの間を通過しカラムの最下層に沈殿する。この遠心操作は 2 つのステップに分かれている。第一のステップは約 55xg の比較的緩やかな遠心で赤血球と生理食塩水や血清・低イオン強度溶液 (low-ionic-strength solution, 以下 LISS) 試薬といった液状成分の分離を目的としている。特に抗グロブリン法については、密度勾配法の応用により、非特異性反応を起こし得る赤血球に未結合のタンパク成分と、抗ヒトグロブリンは会合しない仕組みとなっている。このため従来の抗グロブリン法において必須であった洗浄操作は不要となっている。第二のステップは約 199xg の高速遠心で凝集赤血球と非凝集赤血球の分離・識別を目的としている。このステップにおいて先述のフィルター効果を利用し、凝集赤血球のカラム相へのトラップを行う¹⁴ (図 2)。

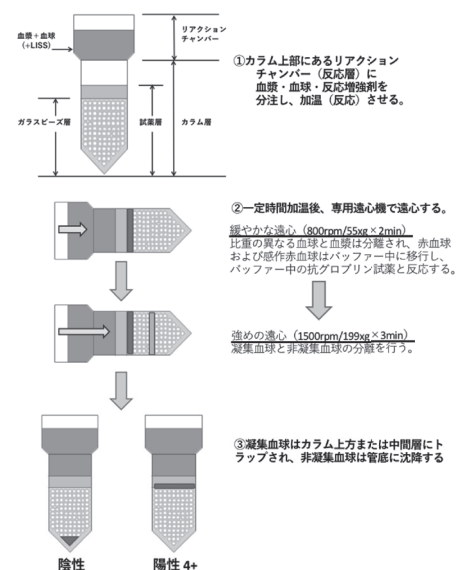


図2 カラム凝集法原理 (文献 14 より一部引用改変)

表 1 試験管法とカラム凝集法の長所・短所 (文献 15 より一部引用改変)

	試験管法	カラム凝集法
長所	<ul style="list-style-type: none"> 検体数が少ない場合、検査に要する時間が短く、緊急対応が可能 低コスト 	<ul style="list-style-type: none"> 検体量、試薬料が一定 操作手順が完全標準化 再現性が高い 検体量の微量化 間接抗グロブリン法における血球洗浄が不要 判定が容易かつ客観的に実施可能 反応像が安定、カードのコピー可能 自動化が可能 バイオハザードの低減
短所	<ul style="list-style-type: none"> 検体量、試薬料にばらつきがある 間接抗グロブリン法では血球洗浄が必要 再現性が低い 判定に熟練を要する 判定後の試験管(反応像)の保存不可 検体数が多い場合、準備に手間がかかる 自動化が困難 	<ul style="list-style-type: none"> 検体数が少ない場合、検査に要する時間が長く、緊急性に乏しい 高コスト

5-2. 抗体価検査の方法

表 1 に示すように CAT と TT にはそれぞれ長所と短所があることが知られている。検査法に関してはこれまでにいくつかの比較検討が報告されている^{16,17}。Kumlien¹⁸らは、3つのセンターで同じ血液サンプルを分析し、ゲルカラム凝集法による赤血球凝集反応が TT よりも再現性が高いことを示した。フローサイトメトリーは、試験管法や CAT と比較して優れた再現性を示し、コンピューターによる自動分析であるため、客観的かつ正確な測定法である¹⁹。しかし、輸血検査の大部分は TT と CAT であるため、輸血検査においてフローサイトメトリーは汎用化されていないのが現状である。

6. 抗体価検査の自動測定

近年、CAT に基づく全行程全自動で抗体価測定が可能な全自動輸血検査装置 (以下、auto-CAT) が開発され、その性能について報告されている。血液型、不規則抗体スクリーニング等、以前からの輸血検査に加え、抗体価検査では希釈系列の作成、血漿・試薬分注操作、結果判定までを全自動で行うことができる²⁰。

TT と CAT の差異については、佐々木¹⁷らは不規則抗体検出法の Polyethylene glycol-IAT (試験管法) と比較して CAT の陽性率を検討し、CAT は 88.2% と良好で、TT と同等程度の検出感度であると報告している。それに対し、不規則抗体の種類によっては TT との一致率が異なるとの報告もされている²¹。

前述の通り、抗体価検査も auto-CAT により全自動で実施できるようになった。TT では反応凝集強度が 1+ 以上の凝集を示した血漿の最大希釈倍率の逆数を抗体価として報告しているが、測定原理の異なる auto-CAT においてもカットオフ値を同様に 1+ で扱っていいのかわ不明であった。

加藤²²らは、抗 A 21 件、抗 B 17 件の患者血漿を TT と auto-CAT でそれぞれ測定し、その結果を比較した。TT と DTT 未処理血漿での auto-CAT による IAT と、DTT 処理血漿での auto-CAT による IAT での DTT 処理の結果の影響についても評価を行っている。DTT 未処理血漿との比較では、auto-CAT は 1 管差の範囲内 (TT との相関係数 $r=0.920$) で、60.5% (23/38 例) で auto-CAT が TT よりも低力価となった。DTT 処理血漿との比較では、すべて 1 管差の範囲内で良好な相関関係 ($r=0.919$) としている。DTT 処理における相関係数に差はなく、DTT の使用に関して明確な差はないとした。しかし自動測定で判明した auto-CAT の結果を報告値として扱っていないかについては言及していない。

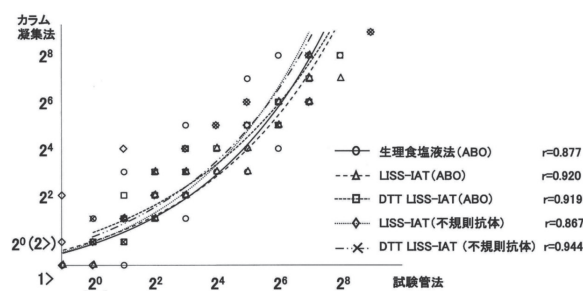


図 3 TT と CAT による抗 A/B 抗体価と不規則抗体価の相関図 (文献 22 より引用)
生理食塩液法による抗 A/B と LISS-IAT による不規則抗体価では、強い相関関係が認められた。また、LISS-IAT と DTT 処理 LISS-IAT による抗 A/B 抗体価と不規則抗体価でも、非常に強い相関関係が認められる。(文献 22 より引用改変)

我々は、TT と auto-CAT の抗 A/B 抗体価測定結果の一致度合いを調べ、また auto-CAT で測定した際のカットオフ値の設定を試みた²³。健常人の A 型、B 型、O 型それぞれ 10 例の抗 A/B 抗体価について auto-CAT のカットオフを TT と同様の 1+ で行った場合、これら 2 法の抗体価の一致率は DTT 処理血漿では、23% ($\kappa=0.131$)、DTT 未処理血漿では 33% (κ

=0.257)であった。auto-CATのカットオフ値を1管差下げたw+ではDTT未処理血漿で30% ($\kappa = 0.241$), DTT処理血漿で45% ($\kappa = 0.386$)の一致率を示し、DTT処理血漿を用い、auto-CATのカットオフ値をw+にすることで最もTTと一致することを報告した²³(表2)。さらに、管差を考慮した重み付けの κ 係数も比較した。カットオフ値1+の一致度はDTT未処理 $\kappa = 0.9849$, DTT処理 $\kappa = 0.9890$, カットオフ値w+ではDTT未処理 $\kappa = 0.9715$, DTT処理 $\kappa = 0.9942$ となり、こちらもauto-CATではカットオフ値w+, DTT処理血漿を用いて抗体価検査を行うことを支持するものであった(表3)。

被験血漿をDTT処理することでカラムの目詰まりなどを引き起こしCATで偽陽性反応を呈することを懸念したが、それらの反応は認めなかった。DTTを使用することでTTとauto-CAT結果抗体価の差が小さくなり、IgMの測り込みを防止し、IgGの反応を高精度に検出するためにauto-CATにおいてDTT処理は行うべき操作であると考えられた。

表2 カットオフ値における抗体価の一致度合い(文献23より引用改変)

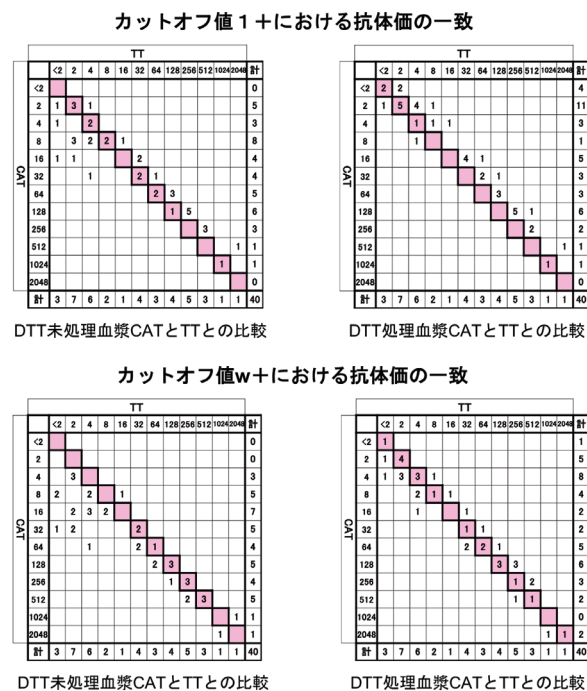


表3 DTT処理効果とカットオフ値における一致度合い(文献23より引用改変)

		Cut-off value	一致率	κ 係数	重み付け κ
Auto-CAT	DTT処理血漿	1+	23%	0.131	0.989
		w+	45%	0.386	0.994
	DTT未処理血漿	1+	33%	0.257	0.985
		w+	30%	0.241	0.972

7. 今後の展望

全自動抗体価測定の問題点は、DTT処理操作を自動で行うことは難しく、DTT処理を含めた全行程の自動測定を行うことができない点、これまでの検討が単施設の小規模で行われている点である。

全自動で抗体価検査を行うことで、測定者間差や施設間差の低減に繋がり、より精度の高い検査結果を臨床側に提供し、抗体価検査を通じて適切な医療介入の判断をサポートすることができる。また、検査室の省力化につながることを期待される。

文 献

- 1) Shimmura H, Tanabe K, Ishikawa N, Tokumoto T, Takahashi K, and Toma H : Role of anti-A/B antibody titers in results of ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplantation*. 2000 ; 70(9) : 1331 – 1335.
- 2) 石田清人, 高橋祐司, 川上麻衣, 小野綾子, 亀石直子, 野崎正行, 高橋智哉, 高橋俊司, 藤川正人, 福澤信之, 平野哲夫, 原田 浩 : ABO不適合腎移植における術前抗体価とARMリスクの検討. *日臨腎移植会誌*. 2014 ; 2(1) : 62 – 67.
- 3) Alexandre GPJ, Pirson Y, Squifflet JP, De Bruyère M, Latinne D, Moriau M, Ikabu N, and Carlier M : Splenectomy As a Prerequisite for Successful Human ABO-incompatible Renal-transplantation. *Transplant. Proceedings*. 1985 ; 17 : 138 – 143.
- 4) Tydén G, Kumlien G, and Fehrman I : Successful ABO-incompatible kidney transplantations without splenectomy using antigen-specific immunoadsorption and rituximab. *Transplantation*. 2003 ; 76 : 730 – 731.
- 5) 三宮彰仁, 小山一郎, 中島一朗, 瀧之上昌平, 寺岡 慧 : Rituximab投与脾臓温存 ABO式血液型不適合者間腎移植と ABO式血液型適合者間腎移植の比較検討. *移植*. 2012 ; 47 : 462 – 469.
- 6) 日本移植学会・日本臨床腎移植学会 : 腎移植臨床登録集計報告(2016) 2015年実施症例の集計報告と追跡調査結果. *移植*. 2016 ; 51 : 124 – 144.

- 7) 小角幸人, 花房 徹, 高原史郎, 野々村祝夫, 東治人, 仲谷達也, 山口誓司, 江左篤信, 金 卓, 植村天受, 能勢和宏, 西岡 伯, 松田公志, 阪口勝彦, 客野宮治, 熊田憲彦, 岡田卓也, 藤本宜正 : 大阪府で行われた腎移植に関する実態調査. 大阪透析研究会誌. 2017 ; 35(2) : 165 – 178.
- 8) American Association of Blood Banks (AABB) 柴田洋一監訳 : Technical Manual 13Th Edition 日本語版. 文祥堂, 東京. 2002 ; 752 – 753.
- 9) Okuno T and Kondelis N : Evaluation of dithiothreitol (DTT) for inactivation of IgM antibodies. *J. Clin. Pathol.* 1978 ; 31 : 1152 – 1155.
- 10) Pirofsky B and Rosner E R : DTT Test : A New Method to Differentiate IgM and IgG Erythrocyte Antibodies. *Vox Sang.* 1974 ; 27 : 480 – 488.
- 11) R. C. Knight : Measuring IgG anti-A/B titers using dithiothreitol (DTT). *J. Clin. Pathol.* 1978 ; 31 : 283 – 287.
- 12) Kobayashi T and Saito K : A series of surveys on assay for anti-A/B antibody by Japanese ABO-incompatible Transplantation Committee. *Xenotransplantation.* 2006 ; 13 : 136 – 140.
- 13) 江頭貞臣, 栢森裕三, 濱崎直孝 : 輸血検査の自動化. 臨床病理ビュー. 2003 ; 126 : 67 – 71.
- 14) 古杉光明 : New Technology の活用と輸血の安全性確保—カラム凝集法を中心として—. 生物試料分析. 2003 ; 26(4) : 322 – 331.
- 15) 小黑博之 : 輸血検査の標準化・自動化とリスクマネジメント. 生物試料分析. 2003 ; 26(4) : 332 – 336.
- 16) 細川美香, 大西修司, 阿部 操, 岡前文子, 山岡学, 大谷哲司, 松崎龍典, 寺岡敦子, 岸本裕司, 福原資郎 : カラム凝集法を用いた輸血検査における自動化の問題点—血漿検体の有用性—. 日輸血会誌. 2001 ; 47(3) : 384 – 389.
- 17) 佐々木正照, 山田美加子, 金子礼子, 古谷大輔, 遠藤輝夫, 小林大介, 辻 直樹, 八木橋厚仁, 渡辺直樹 : 各種検査法における赤血球 IgG 性同種抗体の検出感度の検討. 日輸血会誌. 2003 ; 49(5) : 640 – 645.
- 18) Kumlien G, Wilpert J, Säfwenberg J, and Tydén G : Comparing the tube and gel techniques for ABO antibody titration, as performed in three European centers. *Transplantation.* 2007 ; 84 : 17 – 19.
- 19) Tanabe K : Interinstitutional variation in the measurement of anti-A/B antibodies : the Japanese ABO-Incompatible Transplantation Committee survey. *Transplantation.* 2007 ; 84 : 13 – 16.
- 20) 加藤千秋, 渡邊友美, 遠藤比呂子, 前田奈弥, 武村和哉, 松本祐之, 松下 正 : 全自動輸血検査システム ORTHO VISION™ Analyzer の基礎的性能評価—自動検査システムの有用性と限界—. 医学検査. 2016 ; 65(4) : 472 – 481.
- 21) 菅野直子, 小幡 隆, 小野崎文子, 岸野光司, 渡辺一枝, 尾島佐恵子, 大槻郁子, 中木陽子 : カラム凝集法による赤血球凝集反応—試験管法, ビーズ法, ゲル法の比較検討—. 医学検査. 2000 ; 49(6) : 951 – 955.
- 22) 加藤千秋, 渡邊友美, 遠藤比呂子, 松下 正 : 全自動輸血検査システム ORTHO VISION™ を使用した抗体価測定. 日輸血細胞治療会誌. 2017 ; 63(4) : 585 – 591.
- 23) Matsuura H, Akatsuka Y, Matsuno T, Sugiura Y, Arakawa S, Oikawa S, Yoshida J, Kosugi M, and Emi N : Comparison of the tube test and column agglutination techniques for anti-A/B antibody titration in healthy individuals. *Vox Sang.* 2017 ; in press.