

輸血検査 2.

不規則抗体検査、交差適合試験

埼玉医科大学国際医療センター 輸血・細胞移植部

石田 明

I. 不規則抗体檢查

1. 不規則抗体
2. 不規則抗体檢查

II. 交差適合試驗

1. 交差適合試驗

赤血球型検査（赤血球系検査）ガイドライン（改訂4版）

奥田 誠¹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾ 池本 純子²⁾¹⁵⁾ 石丸 健³⁾¹⁵⁾ 内川 誠⁴⁾¹⁵⁾ 梶原 道子⁵⁾¹⁵⁾
北澤 淳一⁶⁾¹⁴⁾¹⁵⁾ 園分寺 晃⁷⁾¹⁵⁾ 小山 典久⁸⁾¹⁵⁾ 竹下 明裕⁹⁾¹⁵⁾ 三浦 邦彦¹⁰⁾¹⁵⁾
安田 広康¹¹⁾¹⁵⁾ 松本 雅則¹²⁾¹⁴⁾ 松下 正¹³⁾¹⁴⁾

キーワード：血液型、不規則抗体、交差適合試験、ガイドライン

赤血球型検査（赤血球系検査）ガイドライン（改訂4版）作成の経緯

2003年5月に日本輸血学会から初めて赤血球型検査（赤血球系検査）ガイドライン¹⁾が発行された。内容は、赤血球抗体の臨床的意義、患者検体、不規則抗体スクリーニング、不規則抗体の判定、自己抗体であった。2014年12月、赤血球型検査（赤血球系検査）ガイドラインが大幅に改訂され赤血球型検査（赤血球系検査）ガイドライン改訂版²⁾として発行した。2016年10月に赤血球型検査（赤血球系検査）ガイドライン（改訂2版）³⁾として抗D試薬の直後判定、間接抗グロブリン試験、反応増強剤、不規則抗体スクリーニングに用いる検査法、日本人に検出される不規則抗体や分子標的治療薬の対処法などが記載され小改訂された。赤血球型検査（赤血球系検査）ガイドライン（改訂3版）⁴⁾については、輸血療法の実施に関する指針の改定に伴う内容変更と、日本から出されたエビデンスをもとに、乳児の赤血球系検査を中心に改訂作業を行った。

今回の主な改訂は、ABO血液型の亜型での不規則抗体A₁または抗Bへの対応として血液製剤の選択を記載した。不規則抗体スクリーニングでは、検査で使用する数本の赤血球試薬を用いて抗体特異性の推定は困難と考えた。不規則抗体スクリーニングにおける抗体の推定の考え方について整理した。そして、コンピュータクロスマッチの条件についても明瞭にした。

この改訂4版は、赤血球型検査を行うすべての方々にとって、より有用なガイドラインとなることを確信している。巻末には改訂3版との新旧対照表を貼付した。

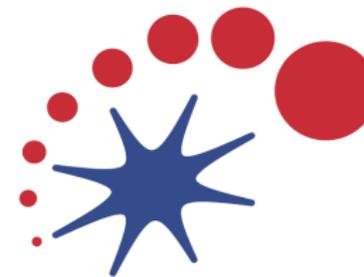
日本輸血・細胞治療学会 理事長 松下 正
同ガイドライン委員会委員長 松本雅則
同赤血球型検査（赤血球系検査）ガイドライン小委員会委員長 奥田 誠

- 1) 東邦大学医療センター大森病院輸血部
- 2) 兵庫医科大学病院輸血・細胞治療センター
- 3) 日本赤十字社血液事業本部技術部
- 4) 関東甲信越ブロック血液センター
- 5) 東京医科歯科大学医学部附属病院輸血・細胞治療センター
- 6) 青森県立中央病院臨床検査部
- 7) 広島国際大学保健医療学部
- 8) 豊橋市民病院小児科
- 9) 浜松医科大学医学部附属病院輸血細胞治療部
- 10) 日本赤十字社北海道ブロック血液センター品質部
- 11) 福島県立総合衛生学院
- 12) 奈良県立医科大学附属病院輸血部
- 13) 名古屋大学医学部附属病院輸血部
- 14) 日本輸血・細胞治療学会ガイドライン委員会
- 15) 日本輸血・細胞治療学会赤血球型検査ガイドライン小委員会

〔受付日：2022年9月14日、受理日：2022年10月19日〕

輸血のための検査マニュアル

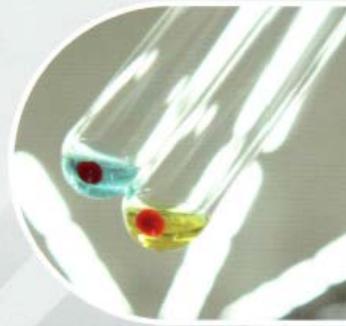
Ver.1.4



日本輸血・細胞治療学会
輸血検査技術講習委員会

上記テキストから抜粋、引用、改変したものを本講義のスライドおよびスライド資料の図表の一部に使用しました

フローチャートと 動画でみる 輸血検査



一般社団法人 日本輸血・細胞治療学会 [監修]

奥田 誠 / 井手大輔 / 日高陽子 / 伊藤正一 / 松浦秀哲 / 北崎英晃 [編]

丸善出版

JAMT 技術教本シリーズ

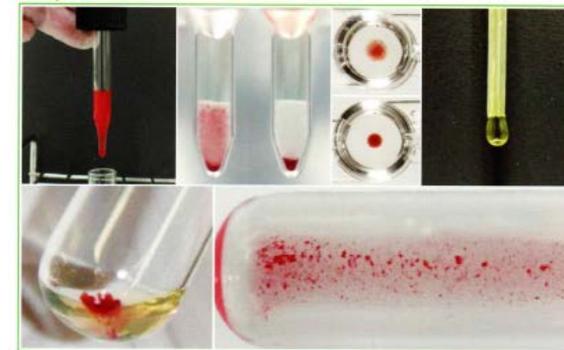
第2版

輸血・移植検査 技術教本

監修 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会



TRANSFUSION MEDICINE



丸善出版

上記テキストから抜粋、引用、改変したものを本講義のスライドおよびスライド資料の図表の一部に使用しました

I. 不規則抗体檢查

1. 不規則抗体

規則抗体と不規則抗体

- 規則抗体とは… ランドシュタイナーの法則にしたがう抗体
= 対応する抗原が陰性の場合には常に存在する
* 抗A、抗B
- 不規則抗体とは… ランドシュタイナーの法則にしたがわない抗体
= 対応する抗原が陰性でも存在するわけではない
* 抗A、抗B以外の赤血球抗原に対する抗体

不規則抗体は検査対象者の1%～数%にみられるとされている

不規則抗体と免疫抗体

- 免疫抗体とは… 輸血や妊娠などの同種免疫刺激によって産生される抗体

⇔ 自然抗体：同種免疫によらず産生される抗体（例：抗A、抗B）

抗A、抗B以外の赤血球抗体の多くが免疫抗体である

輸血（妊娠）による免疫応答

- 一次免疫応答

輸血や妊娠によって自分が陰性の血液型抗原にさらされる



免疫抗体の産生

- 二次免疫応答

輸血や妊娠によって同じ血液型抗原にさらされる



急激な抗体の産生、抗原抗体反応による抗原の排除

※ **輸血の場合は… 溶血性輸血反応(HTR)**

胎児新生児溶血性疾患(HDFN)

不規則抗体の臨床的意義

- 不規則抗体すべてが赤血球溶血を起こすわけではない
不規則抗体には、臨床的に問題となるものと問題にならないものとがある
//
- 臨床的意義のある抗体とは…
対応抗原を保有している非自己赤血球を体内で破壊し（＝温式同種抗体）
溶血性輸血副反応(HTR)や胎児新生児溶血性疾患(HDFN)の原因となる抗体
- **臨床的に意義のある抗体を有する患者が輸血を行う場合は**
対応する抗原が陰性の赤血球製剤（抗原陰性血）を使用する

溶血性輸血副反応（HTR）

- **急性溶血性輸血副反応（AHTR; Acute Hemolytic Transfusion Reaction）**

輸血開始24時間以内に出現する輸血後溶血反応

血管内溶血を呈し、致死率は高い（10-50%）

ほとんどが輸血過誤によるABO不適合輸血によるもの

不規則抗体によるAHTRの報告もある

- **遅発性溶血性輸血副反応（DHTR; Delayed Hemolytic Transfusion Reaction）**

輸血後24時間以降（多くは輸血後5~14日に発症する輸血後溶血反応）

血管外溶血を呈し、致命的となることは稀

多くは不規則抗体による二次免疫応答が原因となる

新生児溶血性疾患（HDFN）

- **胎児新生児溶血性疾患（HDFN; Hemolytic Disease of Fetus and Newborn）**

母親からの移行抗体によって胎児や新生児の体内で起こる溶血反応
胎盤や臍帯血を通して抗Aや抗B、抗Dなどが胎児や新生児に流れる
抗Aや抗Bが原因の場合は軽度、抗Dが原因の場合は重症になりやすい
治療法：交換輸血、免疫抑制剤など

臨床的に意義のある抗体

	抗体の特異性	臨床的意義	赤血球製剤の選択
	Rh	あり	抗原陰性血が必要
	Duffy	あり	抗原陰性血が必要
	Kidd	あり	抗原陰性血が必要
	Diego	あり	抗原陰性血が必要
	S, s	あり	抗原陰性血が必要
	Kell	あり	抗原陰性血が必要
	M, Le ^a	あり	抗原陰性血が必要
	M, Le _a	なし	選択する必要なし
	P1, N, Le ^b	なし	選択する必要なし
	Xg ^a	なし	選択する必要なし
高頻度抗原に対する抗体			
	Jr ^a	あり	抗原陰性が望ましい
	JMH, Knops, Cost, Chido/Rodgers, KANNO	なし	選択する必要なし
その他の高頻度抗原に対する抗体		特異性、症例毎に異なる	輸血専門家や専門機関に相談
低頻度抗原に対する抗体		特異性、症例毎に異なる	輸血専門家や専門機関に相談

赤血球抗原の発現頻度による分類

低頻度抗原

C^w K Kp^a
Kp^c Js^a Lu^a
Mi^a Wr^a ...

多型性抗原

C c E e S
Fy^b Jk^a Jk^b Di^a
M Le^a ...
Leb P1 N Xg^a ...

高頻度抗原

Fy^a Di^b s
Jr^a Rh17 H
Ku K14 ...
(Dは含まれていない)

1% 99%

日本人の頻度

高頻度抗原

- 高頻度抗原とは… 陰性の頻度が極めて少ない赤血球抗原
- 高頻度抗原に対する抗体が存在すると、間接抗グロブリン試験ですべてのパネル赤血球が陽性となるため、特異性の決定が難しい
- 高頻度抗原の特異性を調べる方法
 - 赤血球抗原検査を行う
 - 酵素および化学処理赤血球との反応性を調べる
 - 蛋白分解酵素：フィシン、トリプシン、 α -キモトリプシン
 - 還元剤試薬：DTT(dithiothreitol)、AET(aminoethylisothiuronium bromide)

低頻度抗原

- 低頻度抗原… 陽性の頻度が極めて少ない赤血球抗原 = 通常は1%以下
自然抗体であることが多い
- 不規則抗体スクリーニング検査では通常陰性となり、交差適合試験で1本だけ陽性となることで気付かれることが多い
- 抗原量に個体差のある赤血球抗原による抗体でも同様の反応態度を示すため、低頻度抗原と間違われることがある
- 適合血の選択に苦勞することはほぼない

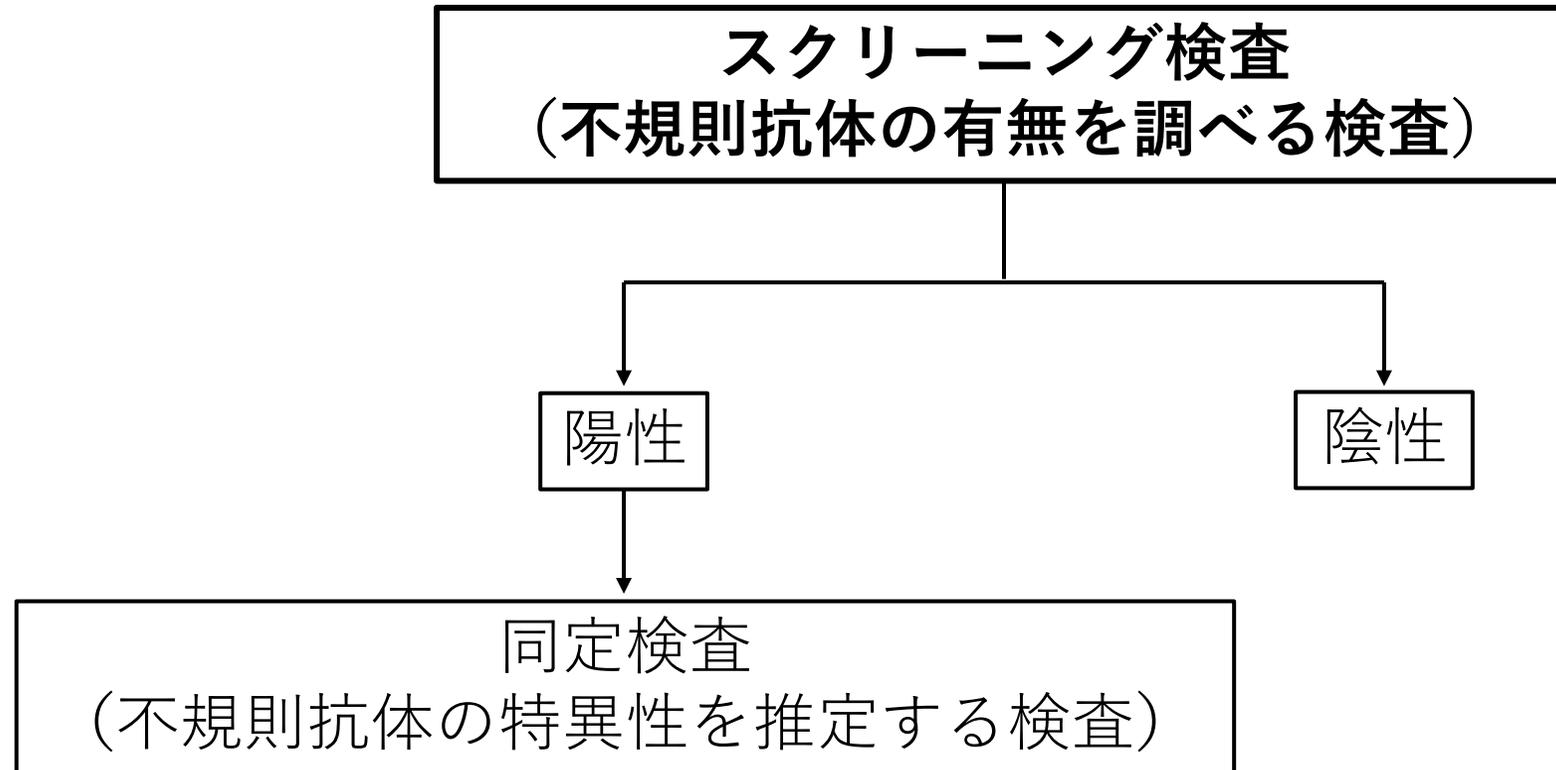
1. 不規則抗体檢查

2. 不規則抗体檢查

不規則抗体検査の留意点

- 間接抗グロブリン試験を含む方法で行う
（臨床的意義のある抗体を検出するため）
- 間接抗グロブリン試験は高感度な方法で行う
（反応増強剤による試験管法、カラム凝集法、固相マイクロプレート法など）
- スクリーニング検査が陽性になった場合は引き続き同定検査を行い、臨床的意義を考察する
- 臨床的意義のある抗体を有する患者、過去に臨床的意義のある抗体の保有歴がある患者の赤血球輸血は、対応抗原陰性血を選択する
- 過去3ヶ月以内に輸血歴や妊娠歴がある患者、およびこれらが不明な患者は、輸血予定日から3日以内に採血した検体を用いて行う

不規則抗体検査の流れ

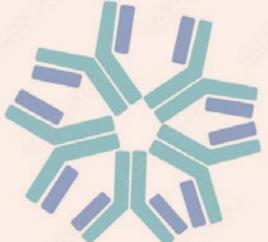


主な検査方法とその原理・特徴

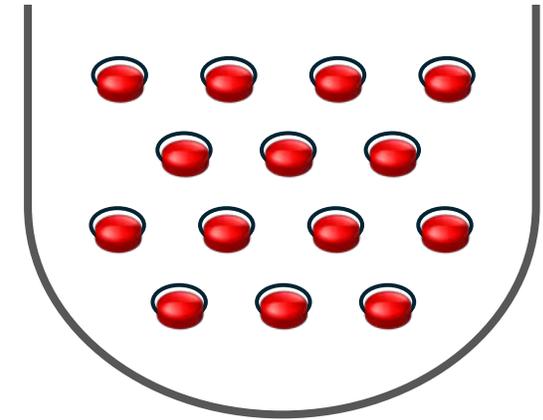
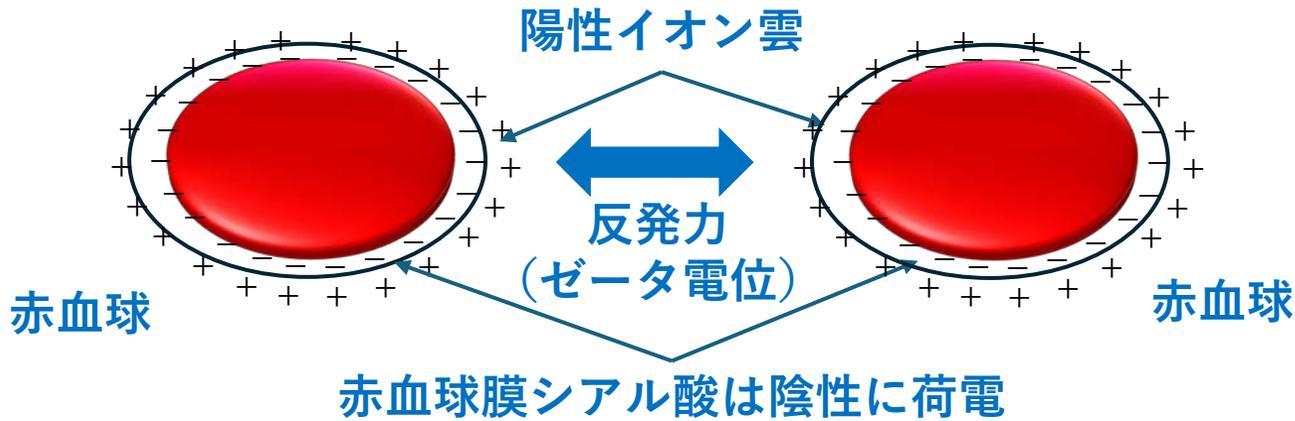
	検査方法	原理	特徴
	生理食塩水法 (Sal法)	IgM型抗体は凝集するが IgG型抗体は凝集しない	<ul style="list-style-type: none">低温反応性抗体、抗A、抗BなどのIgM型抗体の検出には適しているIgG型抗体は検出できない
間接 グロ ブリン 法	反応増強剤無添加 (Sal-IAT)	反応時間は60分	<ul style="list-style-type: none">IgG型抗体の検出にも適している一部のIgG抗体を検出できないことがある
	PEG増強剤使用 (PEG-IAT)	反応時間は10-15分	<ul style="list-style-type: none">反応時間を短縮することができる検出感度はLISS-IATとほぼ同等である自己抗体を検出しやすい
	LISS増強剤使用 (LISS-IAT)	反応時間は10-15分	<ul style="list-style-type: none">反応時間を短縮することができる検出感度はPEG-IATとほぼ同等である

間接抗グロブリン試験（IAT法）は
臨床的意義のある抗体を検出する上で最も信頼できる方法

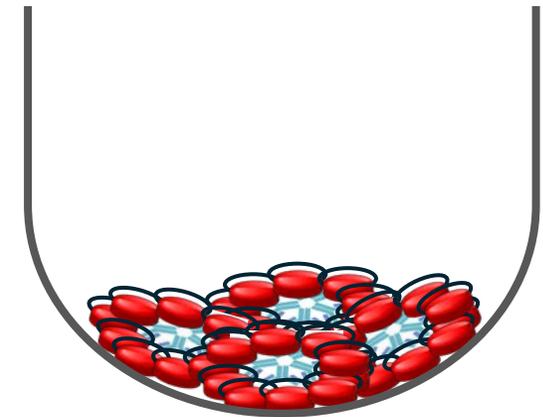
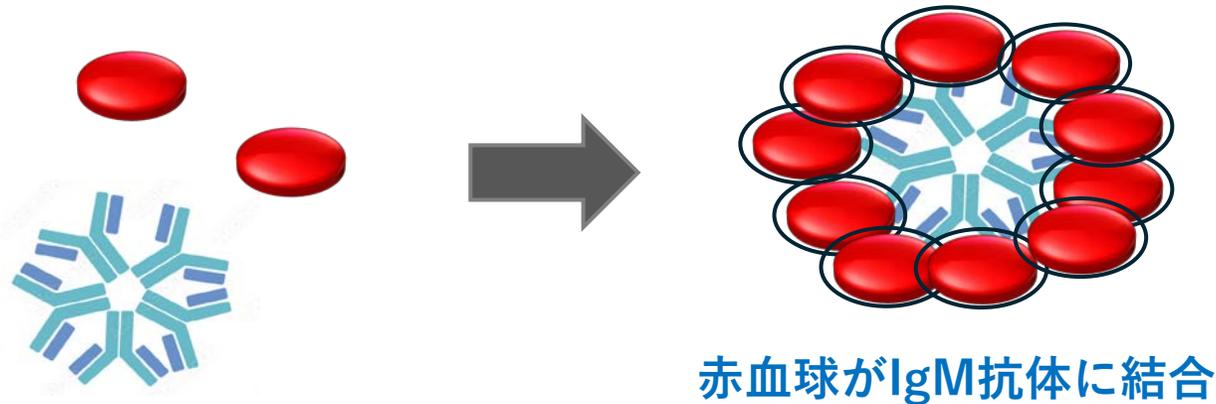
IgM抗体とIgG抗体の特徴

	IgM 	IgG 
構造	5量体	1量体
分子量	75万	15万
抗体の由来	主に自然抗体	主に免疫抗体
反応温度	主に室温以下で反応	主に37°Cで反応
胎盤通過性	胎盤を通過しない	胎盤を通過する
検査での検出	生食法で検出可	IAT法で検出
血液型抗原の特異性	A B H Le ^a Le ^b M N P1 I ...	D C c E e Fy ^a Fy ^b Jk ^a Jk ^b S s Xg ^a Di ^a K k ...

生理食塩液法の原理

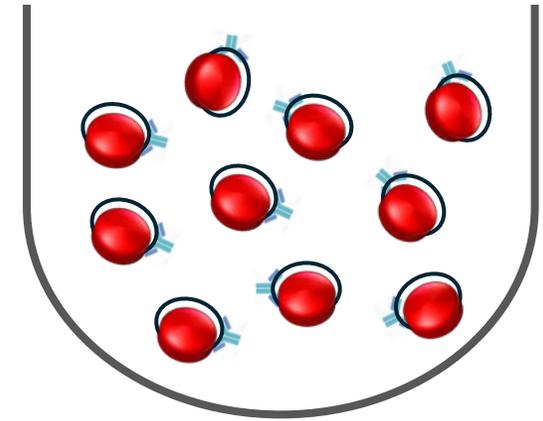
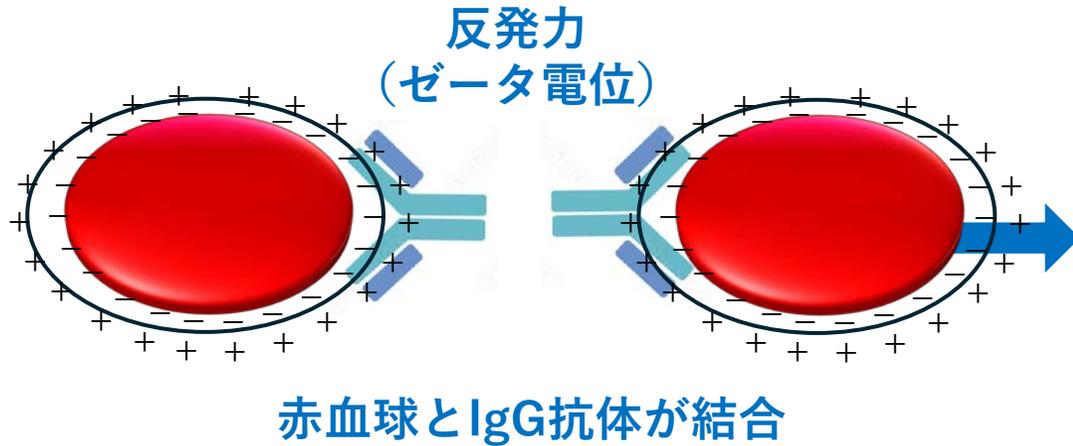


赤血球はゼータ電位によって互いに反発し距離を保っている

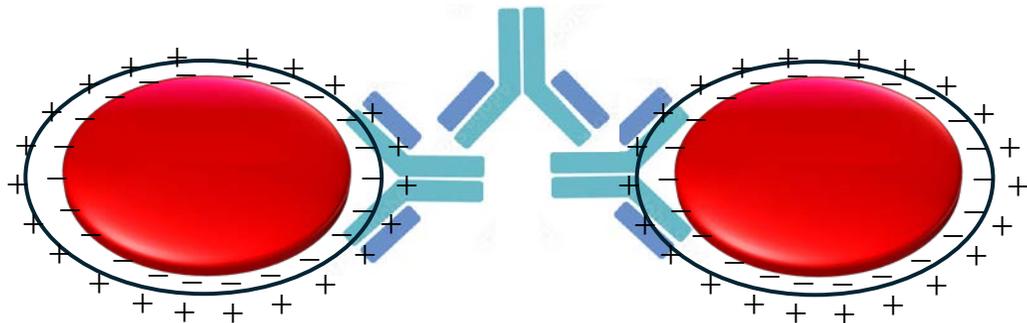


赤血球はIgM抗体と結合すると凝集する

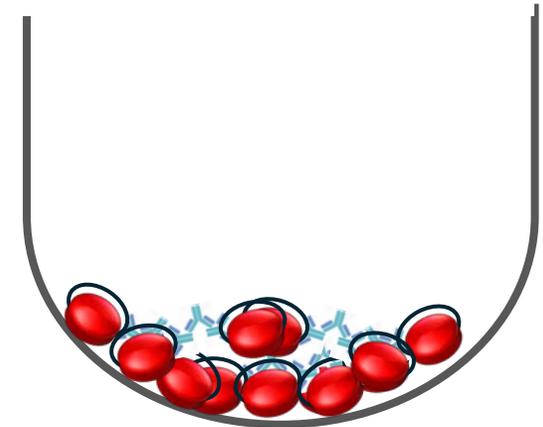
間接グロブリン法(IAT法)の原理



IgGと結合した赤血球は
ゼータ電位の影響で凝集しない



赤血球と結合したIgGに抗グロブリン抗体が結合



IgG抗体と抗グロブリン抗体を介して
赤血球どうしが結合し凝集する

IAT法スクリーニングの検査手順

患者血漿（血清）とスクリーニング赤血球を加える

↓
遠心して判定

↓
反応増強剤を滴下し37°Cで10~15分静置
（反応増強剤を使用しない場合は37°Cで60分間静置）

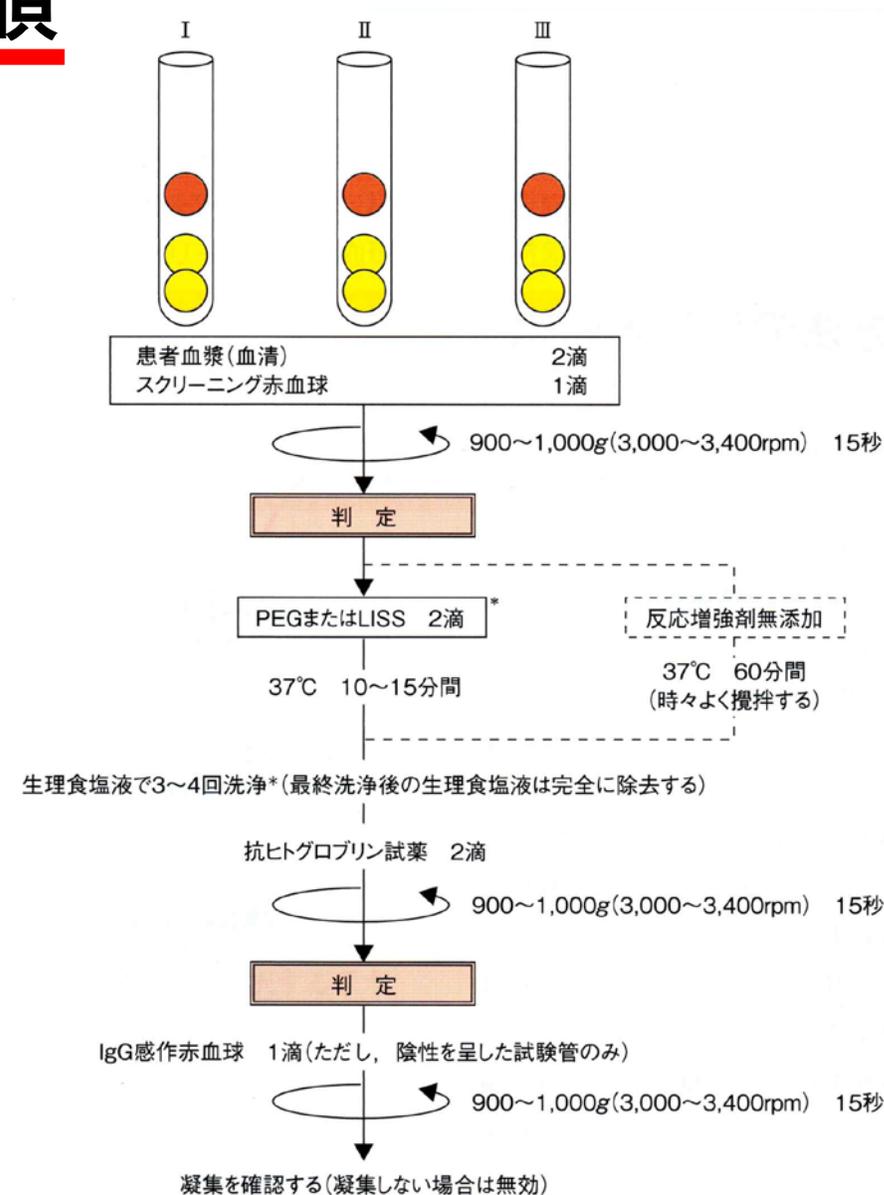
↓
生理食塩水で3~4回洗浄

↓
抗ヒトグロブリン試薬を滴下

↓
遠心して判定

↓
IgG感作赤血球を滴下（陰性を呈した試験管のみ）

↓
凝集を確認する（凝集しない場合は無効）



スクリーニング赤血球試薬の条件

① O型赤血球で構成されていること（抗A、抗Bと反応しない）

② 主な赤血球抗原（以下）が陽性であること

C c D E e Di^a Di^b Fy^a Fy^b Jk^a Jk^b S s M N P1 Le^a Le^b

③ 以下の赤血球抗原はホモ接合体の赤血球を含むことが望ましい

C c E e Jk^a Jk^b Fy^a Fy^b S s

※ 少なくとも2種類の赤血球を組み合わせて使用

※ スクリーニング赤血球を混合して用いないこと



反応増強剤について

- 反応増強剤を用いることのメリットとは…
 - 反応時間の短縮と反応感度の上昇（一部の抗体）

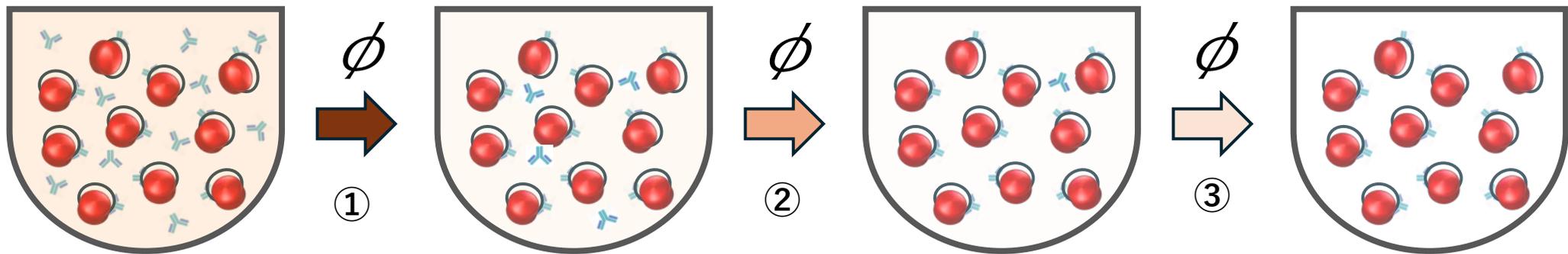
<反応増強剤の種類>

- ポリエチレングリコール (Polyethylene glycol ; PEG)
- アルブミン



洗浄操作について

- 洗浄操作…血漿中のIgGを完全に除去して反応を確実にするために重要
- 洗浄が不十分だと血漿中に残存したIgGが抗グロブリンと結合してしまう
→赤血球と結合した抗体と抗グロブリンとの反応が弱くなってしまう





IgG感作赤血球による確認について

- 洗浄がきちんとできていることを確認するため
- 抗グロブリン試薬がきちんと働いていることを確認するため
- 試験系に抗グロブリン試薬が十分量含まれていることを確認するため

不規則抗体スクリーニング検査の結果

Cell No	Rh					Kell		Duffy		kidd		Lewis		MNS				P	Test Results			
	D	C	E	c	e	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	M	N	S	s	P ₁	Sal	IAT	IgG感作赤血球	
P1	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	0	2+	NT
P2	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	0	0	0	+
P3	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	2+	NT

消去法

- 消去法とは…患者血漿と陰性反応を呈したパネル赤血球に発現している各種抗原に対する抗体を1つずつ否定し、抗体の特異性を推定する方法
- 量的効果のある抗原については、ヘテロ接合体のパネル赤血球の反応が陰性でも対応抗原に対する抗体は否定できない
- 量的効果を考慮すべき血液型：Rh、Kidd、Duffy、MNSなど
- 量的効果を考慮しなくて良いものは『×』、考慮するものは『/』を記載
- 『×』が1つ以上ある抗原名に『×』を記載

不規則抗体スクリーニング検査の結果判定

Cell No	Rh					Kell		Duffy		kidd		Lewis		MNS				P	Test Results		
	D	C	E	e	e	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	M	N	S	s	P ₁	Sal	IAT	IgG感作赤血球
P1	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	2+	NT
P2	*	0	*	*	0	*	*	+	+	0	*	*	0	*	0	0	*	*	0	0	+
P3	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	2+	NT

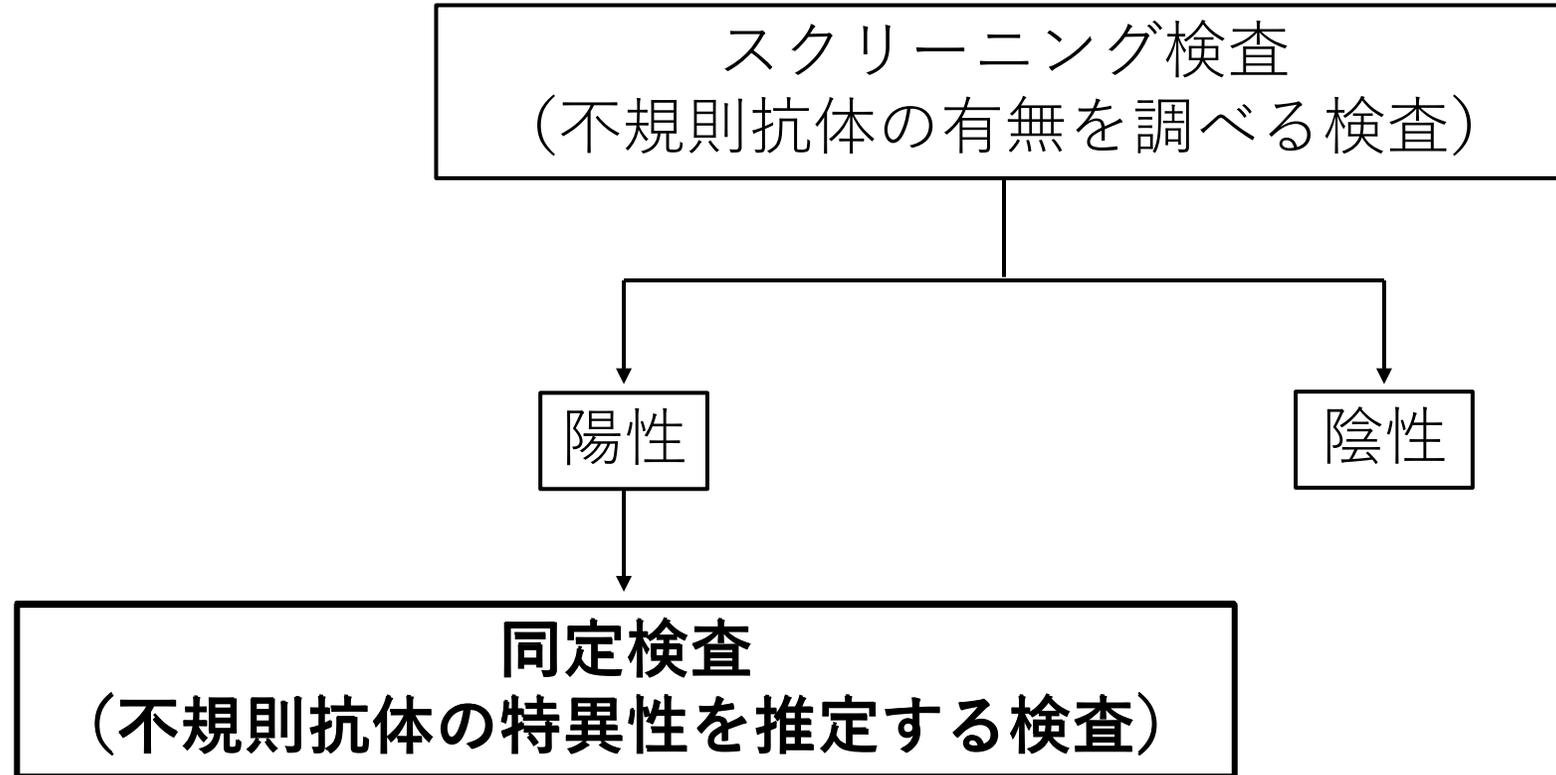
否定できない抗体を消去法で推定すると、以下の9抗体が推定された

抗C 抗e 抗Fy^a 抗Fy^b 抗Jk^a 抗Le^b 抗N 抗S 抗Di^a

量的効果の可能性があるため否定できない抗体に含める

Di^aは否定できない抗体に含める

不規則抗体検査の流れ



同定検査の進め方

パネル赤血球による同定検査



- ① 反応態度の確認
- ② 患者情報の収集
- ③ 追加試験の検討
- ④ パネルの追加
- ⑤ 統計学的評価



抗体特異性の絞り込み

パネル赤血球による同定検査の手順

患者血漿（血清）とパネル赤血球を加える

↓
遠心して判定

↓
反応増強剤を滴下し37°Cで10~15分静置
（反応増強剤を使用しない場合は37°Cで60分間静置）

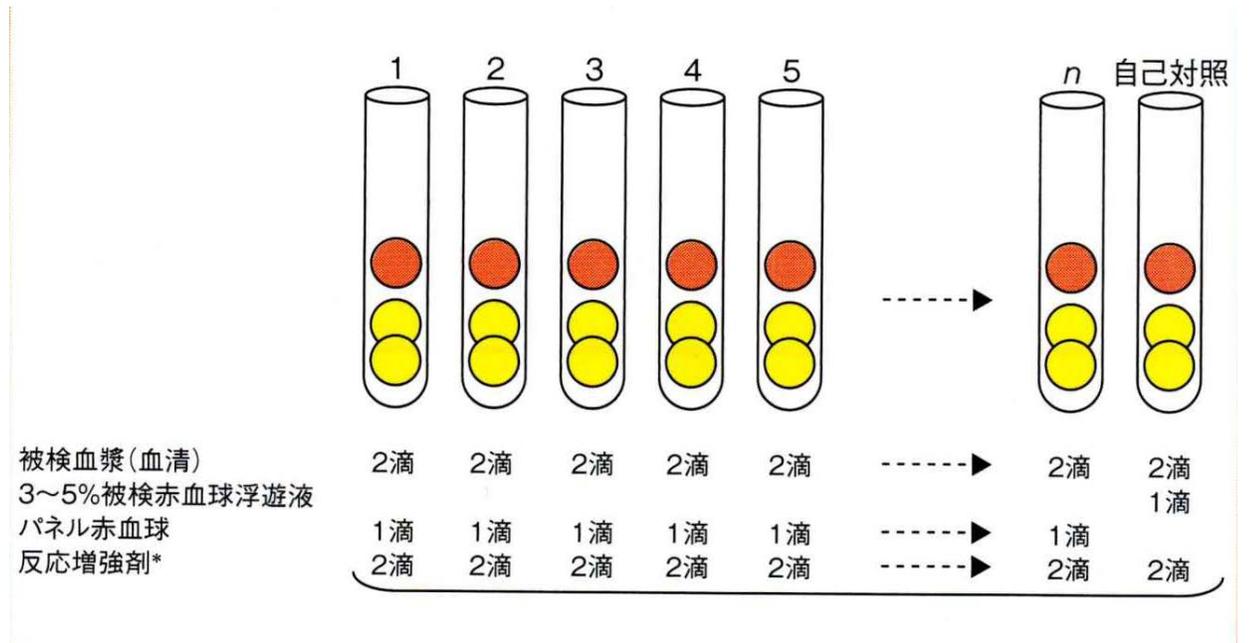
↓
生理食塩水で3~4回洗浄

↓
抗ヒトグロブリン試薬を滴下

↓
遠心して判定

↓
IgG感作赤血球を滴下（陰性を呈した試験管のみ）

↓
凝集を確認する（凝集しない場合は無効）



- 自己対照についても同時に検査する
- 反応を増強・減弱する目的でAET、DTT、ZZAP、クロロキンなどの化学的処理を行うこともある

同定検査による不規則抗体の推定

可能性の高い抗体とは

- 反応パターンが完全に一致する抗原に特異性のある抗体（単一一致）
- 複数の検査法で反応パターンが完全に一致する抗原に特異性のある抗体（複数一致）

可能性の低い抗体とは

- 量的効果を考慮して消去法を行ってみて、
抗原表で消去されず残ったすべての抗原に特異性のある抗体

同定検査の進め方

パネル赤血球による同定検査



- ① 反応態度の確認
- ② 患者情報の収集
- ③ 追加試験の検討
- ④ パネルの追加
- ⑤ 統計学的評価



抗体特異性の絞り込み

①-1 反応態度の確認

- 確認すべき反応態度とは…
 - 凝集したパネル赤血球の数
 - 凝集反応の強弱
 - 凝集を起こした反応条件や反応パターンなど

①-2 パネル検査結果の解釈と対処法

陽性赤血球	抗体特異性	反応態度	考えられる抗体	対処法
一部 (陰性赤血球あり)	あり	同じ反応相で同じ強さの凝集	単一抗体	1) 消去法で他の抗体を否定 2) 患者赤血球の抗原検査(対応抗原がないことを確認)
		同じ反応相で異なる強さの凝集	量的効果のある単一抗体 または複数抗体	1) 消去法で他の抗体を否定 2) 患者赤血球の抗原検査(対応抗原がないことを確認)
一部 (またはすべて)	あり または 不明	異なる反応相で異なる反応パターン	複数抗体	1) 消去法で可能性の高い抗体、否定できない抗体を確認 2) 酵素法の併用 3) パネル赤血球の追加 4) 患者赤血球の抗原検査(対応抗原がないことを確認)
すべて	不明	同じ反応相で同じ強さの凝集	高頻度抗原に対する抗体 (複数抗体も考慮)	1) 高頻度抗原陰性赤血球との反応を確認 2) 患者赤血球の抗原検査(対応抗原がないことを確認) 3) 吸着解離試験により他の抗体の存在を否定 4) 高頻度抗原と対応抗体の生化学的特徴による検査
すべて	不明	同じ反応相で異なる強さの凝集	高頻度抗原に対する抗体 と他の抗体の共存	1) 高頻度抗原陰性赤血球との反応を確認 2) 患者赤血球の抗原検査(対応抗原がないことを確認) 3) 吸着解離試験により他の抗体の存在を否定 4) 高頻度抗原と対応抗体の生化学的特徴による検査
一部の弱い反応のみ	不明	同じ反応相で弱い強さの凝集	低力価の抗体	1) 反応増強(検体量増量、反応時間延長、酵素処理など) 2) ホモ接合体パネル赤血球の追加 3) 患者赤血球の抗原検査
1～数個	不明	—	低頻度抗原に対する抗体 または抗HLA抗体	1) 低頻度抗原陽性赤血球との反応を確認 2) Bg ^a などHLA抗原を発現している赤血球の反応を確認

② 患者情報の収集

- 収集すべき患者情報とは
 - 疾患名 … 主疾患、併存疾患
 - 治療内容 … 使用中または使用歴のある薬剤
 - 血液検査所見 … 溶血所見の有無
 - 既往歴 … 血液疾患の既往、造血幹細胞移植歴など
 - 妊娠歴・輸血歴
 - 家族歴・出身国
 - 新生児？

③-1 追加試験の検討

- 検討すべき追加試験とは…
 - 生食法（行っていれば不要）
 - 患者赤血球の抗原検査
 - 可溶性抗原による抗体中和
 - 酵素法
 - 吸着解離試験

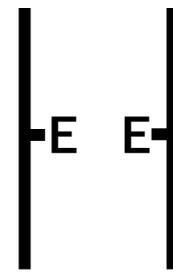
③-2 量的効果について

- ホモ接合体の方がヘテロ接合体より抗原量を多く発現する赤血球抗原がある
 - ⇒ ホモ接合体には反応するがヘテロ接合体には反応しない場合がある
 - ⇒ スクリーニング用赤血球がホモかヘテロかで反応が異なることがある

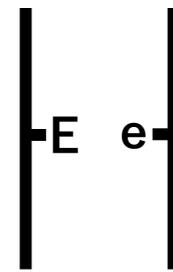
||

量的効果

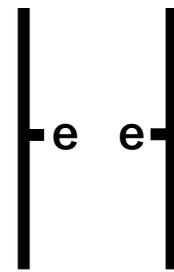
同定検査を行う際は
量的効果を考慮して
判定することが重要



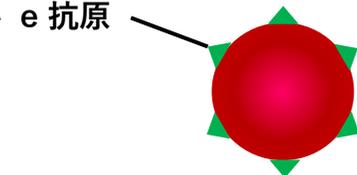
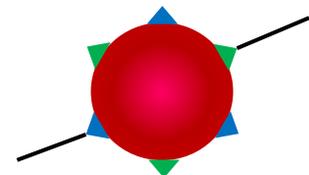
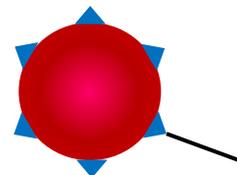
E のホモ接合体



ヘテロ接合体



e のホモ接合体



同定検査の結果

Cell No	Rh					Kell		Duffy		kidd		Lewis		MNS				P	Test Results			
	D	C	E	c	e	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	M	N	S	s	P ₁	Sal	IAT	IgG感作赤血球	
P1	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	2+	NT
P2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	+
P3	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	2+	NT
P4	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	3+	NT
P5	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	0	+
P6	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	2+	NT
P7	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+
P8	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	0	3+	NT
P9	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0	0	+
P10	0	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+
P11	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	0	+
Auto																			0	0	0	+

同定検査の結果

Cell No	Rh					Kell		Duffy		kidd		Lewis		MNS				P	Test Results		
	D	C	E	c	e	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	M	N	S	s	P ₁	Sal	IAT	IgG感作赤血球
P1	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	2+	NT
P2	*	*	0	0	*	0	*	*	0	0	*	*	0	*	*	0	*	*	0	0	+
P3	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	2+	NT
P4	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	3+	NT
P5	0	*	0	*	*	0	*	0	*	0	*	0	*	*	0	0	*	*	0	0	+
P6	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	2+	NT
P7	0	0	0	*	*	*	*	0	*	0	*	*	0	*	0	*	*	*	0	0	+
P8	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	3+	NT
P9	0	0	0	*	*	0	*	0	*	0	*	0	*	*	*	0	*	*	0	0	+
P10	0	0	0	*	*	*	*	*	0	0	*	0	0	*	0	*	*	*	0	0	+
P11	*	*	0	0	*	*	*	0	*	0	*	0	*	*	*	0	*	0	0	0	+
Auto																			0	0	+

同定検査の結果

Cell No	Rh					Kell		Duffy		kidd		Lewis		MNS				P	Test Results		
	D	C	E	c	e	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	M	N	S	s	P ₁	Sal	IAT	IgG感作赤血球
P1	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	2+	NT
P2	*	*	0	0	*	0	*	*	0	0	*	*	0	+	+	0	*	*	0	0	+
P3	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	2+	NT
P4	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	3+	NT
P5	0	*	0	*	*	0	*	0	*	0	*	0	*	*	0	0	*	*	0	0	+
P6	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	2+	NT
P7	0	0	0	*	*	*	*	0	*	0	*	*	0	*	0	*	*	*	0	0	+
P8	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	3+	NT
P9	0	0	0	*	*	0	*	0	*	0	*	0	*	+	+	*	0	*	0	0	+
P10	0	0	0	*	*	*	*	*	0	0	*	0	0	*	0	*	*	*	0	0	+
P11	*	*	0	0	*	*	*	0	*	0	*	0	*	+	+	0	*	0	0	0	+
Auto																			0	0	+

同定検査の結果

スクリーニングの結果をもとに消去

Cell No	Rh					Kell		Duffy		kidd		Lewis		MNS				P			Test Results		
	D	C	E	c	e	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	M	N	S	s	P ₁	Sal	IAT	IgG感作赤血球		
P1	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	2+	NT		
P2	*	*	0	0	*	0	*	*	0	0	*	*	0	+	+	0	*	*	0	0	+		
P3	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	2+	NT		
P4	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	3+	NT		
P5	0	*	0	*	*	0	*	0	*	0	*	*	*	0	0	0	*	*	0	0	+		
P6	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	2+	NT		
P7	0	0	0	*	*	*	*	0	*	0	*	0	*	0	*	*	*	*	0	0	+		
P8	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	3+	NT		
P9	0	0	0	*	*	0	*	0	*	0	*	*	+	+	*	0	*	*	0	0	+		
P10	0	0	0	*	*	*	*	*	0	0	*	0	*	0	*	*	*	*	0	0	+		
P11	*	*	0	0	*	*	*	0	*	0	*	*	+	+	0	*	0	0	0	0	+		
Auto																			0	0	+		

可能性の高い抗体が抗 Jk^a、否定できない抗体が抗N、抗Di^a と推定される

④ パネル赤血球の追加

- 推定される不規則抗体が複数ある場合はパネル赤血球を追加する
- 量的効果のある抗原については、ホモ接合体のパネル赤血球を使用する
例) 抗E、抗Jka、抗Sが候補の場合、以下のパネル赤血球を追加する
① E+ Jk(a-) S- ② E- Jk(a+) S- ③ E- Jk(a-) S+
パネル赤血球との反応結果をもとに抗体特異性を推定する

⑤ Fisher 確率計算法

- パネル赤血球が多いほど判定材料は増えるが、逆に偽陽性や偽陰性となる可能性も高くなる。複数パネル赤血球を使用する場合は偽陽性や偽陰性を誤判定しないようにすることが重要。
- 方法：Fisher確率検定を行う（確率 $p < 0.05$ 未満であれば棄却できる）

例 1) 3種類の陽性赤血球で検査→いずれも凝集あり
3種類の陰性赤血球で検査→いずれも凝集なし

血清反応	+	=	総計
陽性	3	0	3
陰性	0	3	3
総計	3	3	3

Fisher確率 $p = 0.05$ ($p \not< 0.05$)

→ この検査だけで特異抗体と判定することはできない

血清反応	赤血球抗原		総計
	+	-	
陽性	A	B	A+B
陰性	C	D	C+D
総計	A+C	B+D	N

抗体特異性が偽陽性または偽陰性と判定される確率 p は

$$\text{Fisher確率 } p = \frac{(A+B)! \times (C+D)! \times (A+C)! \times (B+D)!}{N! \times A! \times B! \times C! \times D!}$$

例 2) 4種類の陽性赤血球で検査→いずれも凝集あり
4種類の陰性赤血球で検査→いずれも凝集なし

血清反応	+	=	総計
陽性	4	0	4
陰性	0	4	4
総計	4	4	8

Fisher確率 $p = 0.014$ (< 0.05)

→ この検査結果から特異抗体と判定することができる



Di^aについて

- Diego血液型に属する抗原の一つ
- Di^a抗原の発現頻度 白人では稀、日本人では9～10%
⇒ 抗Di^aは不規則抗体の中でも比較的多い
- 抗Di^aは臨床的意義のある抗体
*溶血性輸血副反応（HTR）や新生児溶血性疾患（HDN）の原因となる

スクリーニング検査ではDi(a+)赤血球を使用する必要がある



自己対照について

- 自己対照は陰性コントロールとしての意味で重要
- 患者血漿とパネル赤血球の陽性反応は自己対照が陰性の場合のみ有効

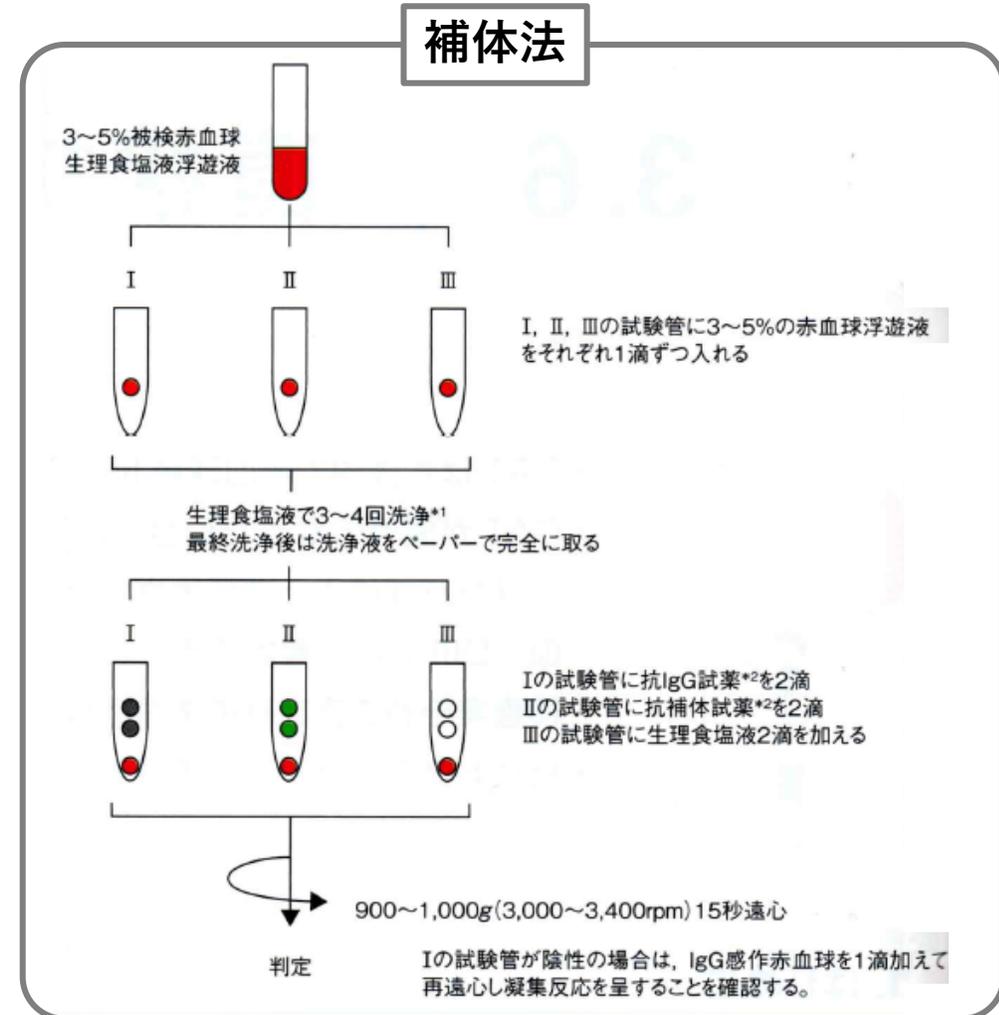
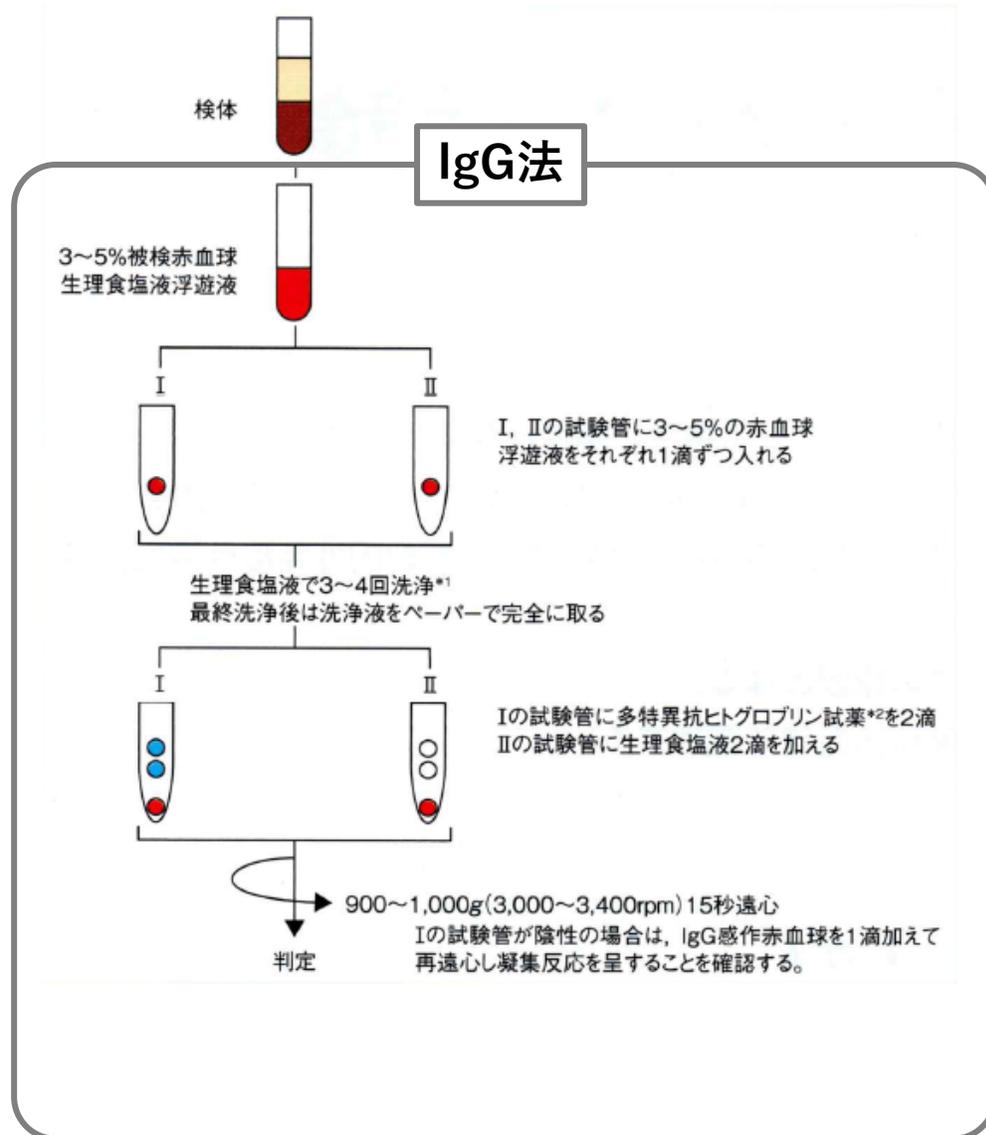
- 自己対照が陽性となった場合、
- ①自己抗体単独
- ②自己抗体と同種抗体の共存
- ③直近の輸血による抗原刺激によって産生された同種抗体
(遅発性溶血性輸血反応を起こす例でよくみられる)
- などの可能性を考慮し、原因究明が必要となる



温式自己抗体と直接抗グロブリン試験

- 温式自己抗体とは…直接抗グロブリン試験で陽性となる抗体
- 直接抗グロブリン試験は自己免疫性溶血性貧血の診断検査として有用
ただし、臨床的に溶血所見のない患者でもしばしば観察される
- 自己抗体が産生される原因について
 - 劣化した赤血球抗原を異物と認識
 - 微生物に対する抗体と赤血球抗原との交差反応
 - 免疫系の異常による免疫寛容の破綻
 - 自己抗体産生が決定付けられた形質細胞の単または多クローン性増殖

直接抗グロブリン試験の手順





高頻度抗原に対する抗体の性状

- 自己対照を除くすべてのパネル赤血球と等しく反応する場合は高頻度抗原に対する抗体を考える
 - 高頻度抗原に対する抗体の同定は困難
 - 生化学的・血清学的性質から特異性をある程度絞り込める場合がある



不規則抗体の血清学的性状

- 至適反応温度

不規則抗体は、至適反応温度によって冷式抗体と温式抗体がある

冷式抗体とは、室温以下（4～25℃）でよく反応する抗体

生理食塩水法で検出される

抗Lewis、抗I、抗P1など

温式抗体とは、30～37℃でよく反応する抗体（IAT法で検出）

間接グロブリン法で検出される

抗Rh、抗Kidd、抗Duffyなど



不規則抗体の生化学的性状

- pHによる影響

一部の抗Mは反応系のpHを6.5まで下げると反応が増強する

抗Rh、抗Fy、抗Jkなどは反応系のpHが6.0より低いと反応性が低下する

- 親和力と凝集力

抗Ch、抗Rg、抗Jr^a、抗JMHによって形成された凝集塊は比較的脆く高力価低親和性（HTLA）抗体とよばれる

HTLA抗体は一般的に臨床的意義は低い



補体結合性抗体の性状

- 抗P、抗PPIP_k（抗Tj_a）、一部の抗Lewis、抗Kiddには補体結合性がある
補体結合性抗体があると、患者血清に補体があると活性化され溶血する

判定時に赤血球が減少・消失している場合は補体結合性抗体を考慮

補体結合性抗体の可能性がある場合の対応

- しばらく保管後に再検査～補体は新鮮血清にのみ含まれている
- EDTA採血検体で再検査～EDTAは補体活性に必要なMg²⁺やCa²⁺をキレートする



患者赤血球の抗原検査

- 不規則抗体が推定された場合、患者赤血球の抗原検査が有効である
検出抗体が同種抗体であれば、対応する患者赤血球抗原は陰性である

例) 抗Eの存在が推定された場合

- ① 抗E試薬を用いて患者血球のE抗原の有無を調べる
- ② E抗原が陰性 → 抗Eの存在は妥当性
- ③ E抗原が陽性 → 自己抗体や他の同種抗体を考慮



可溶性抗原による抗体中和

- 抗体同定が困難な場合は可溶性型物質を添加して抗体を中和するとよい
例) 抗Lewis、抗P1、抗Iなどは市販の可溶性型物質が入手可能



酵素法

- 酵素法とは

ブロメリン、フィシン、パパインなど蛋白分解酵素を用いて赤血球凝集反応を増強し、検査感度を高める検査法

赤血球膜は膜状のシアル酸によってマイナスに荷電している赤血球を蛋白分解酵素で処理すると、蛋白に結合している糖鎖末端のシアル酸が除去されて赤血球間の距離が縮まり凝集しやすくなる

Duffy、MNS、Xg^a、JMHなどは酵素で容易に破壊される

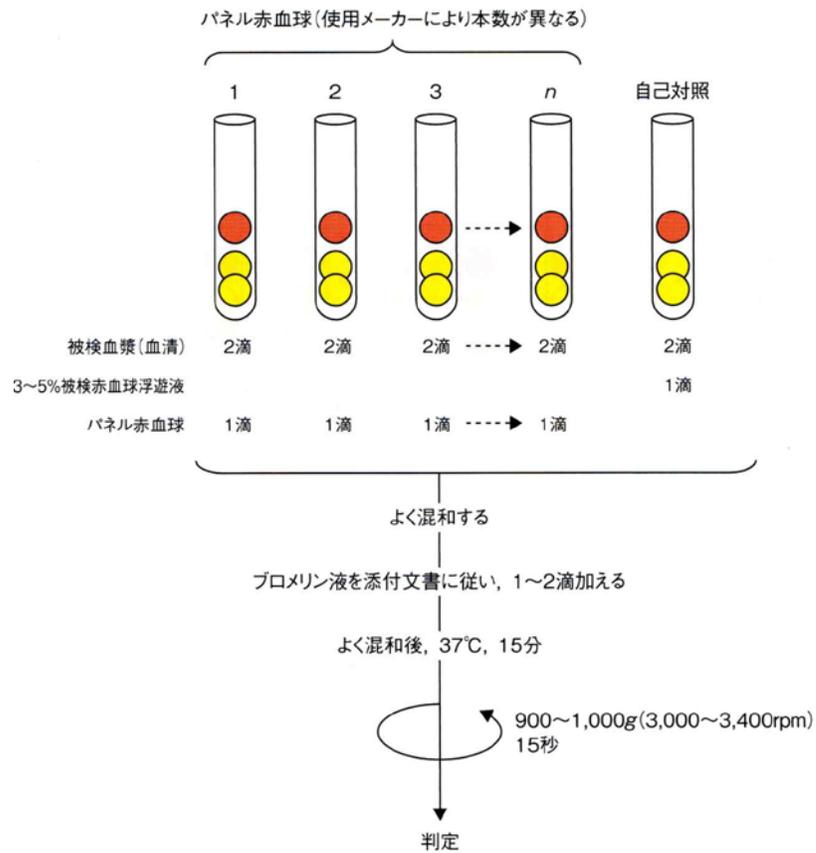
→これらの赤血球抗原に対する抗体は酵素法では検出できない

酵素法だけが陽性となる抗体は臨床的意義が低いとされている

酵素法の手順

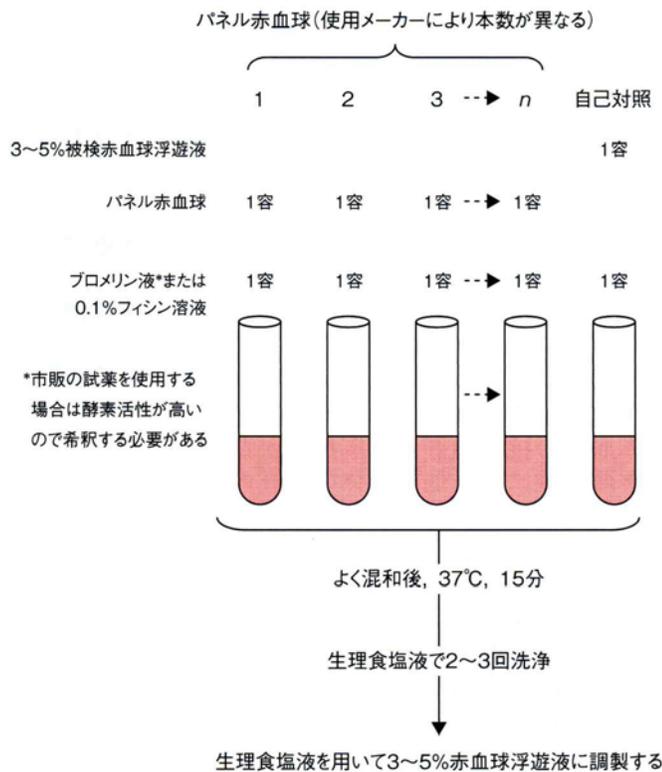
一段法は血漿とパネル赤血球と酵素を同時に加えて判定する方法であるのに対し、二段法はあらかじめパネル赤血球を酵素処理してから血漿と血球を反応させる方法
一段法は短時間で結果が得られるが、二段法の方が感度の高い検査方法である

酵素一段法

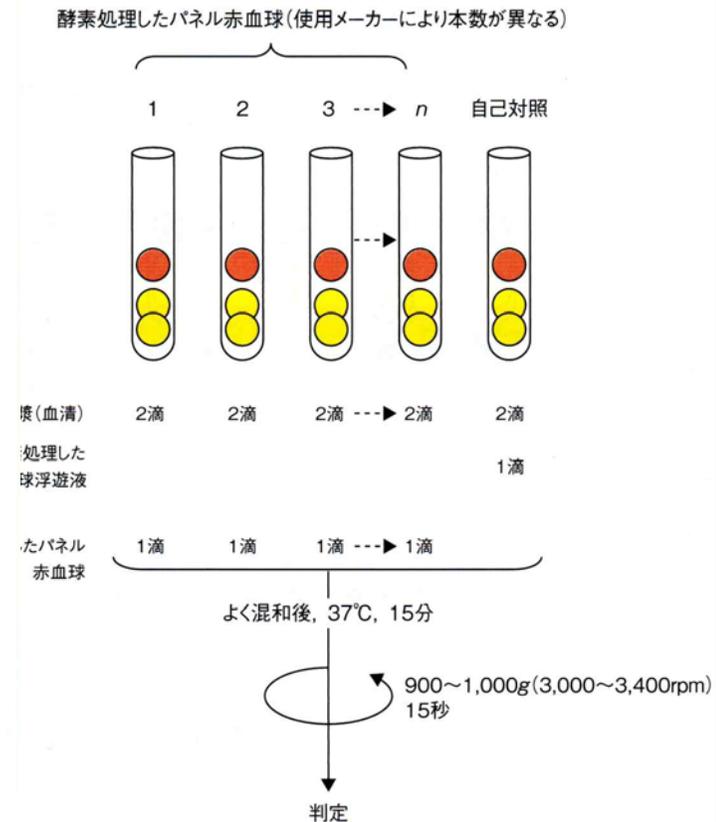


酵素二段法

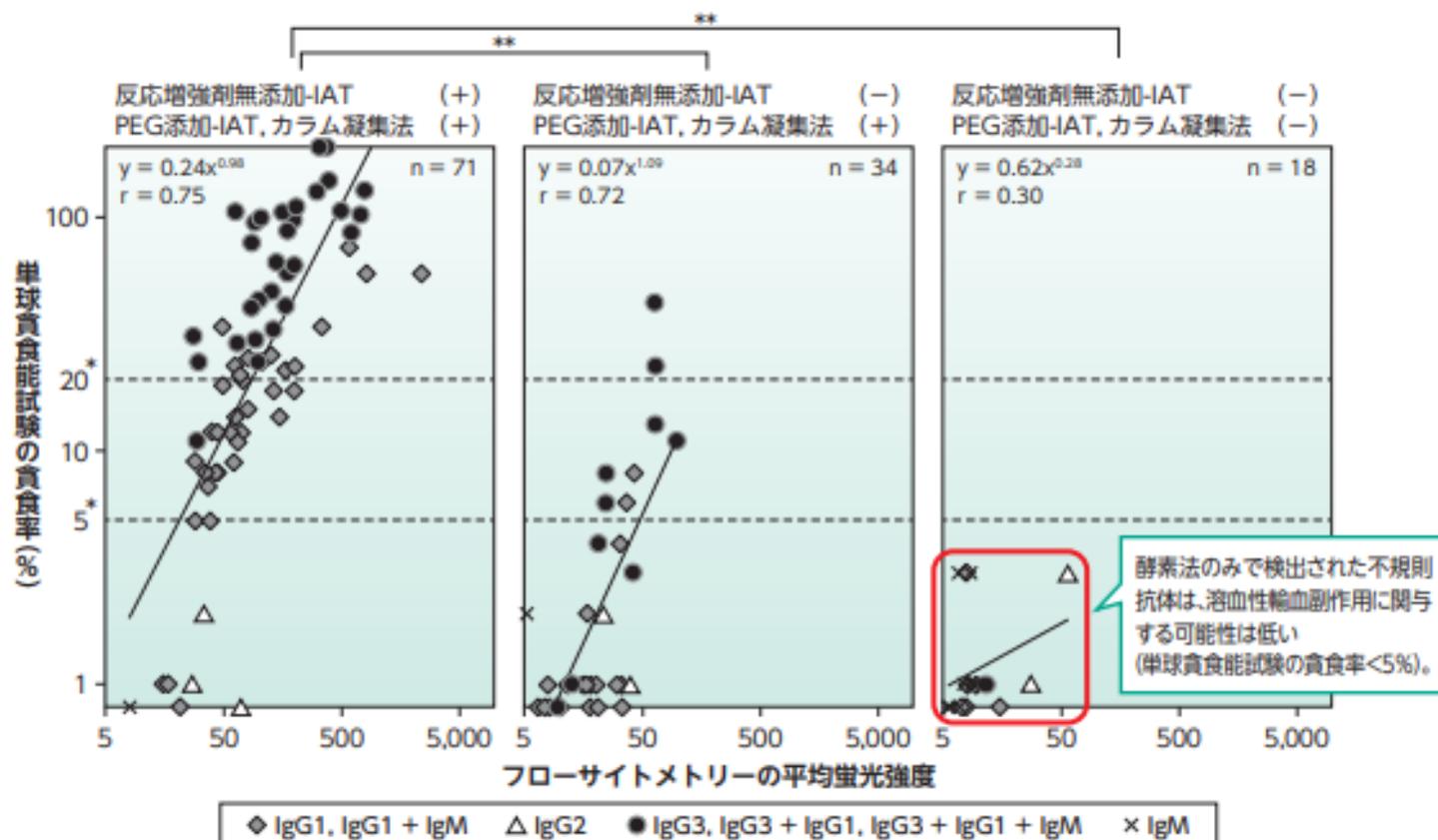
酵素処理赤血球の作成(準備)



本試験



酵素法が陽性の不規則抗体 123 例の性状解析



* 溶血性輸血副作用の発症を予測するためのカットオフ値¹⁴⁾ (0~5%:まず起きない, 5.1~20%:起きる可能性がある, >20%:起きる可能性が高い)。

** 貪食率の有意差 ($P < 0.01$)。

IAT 間接抗グロブリン試験



吸着解離試験

- 複数抗体を保有する患者において抗体絞り込みが困難な場合は、抗体同定に有効な追加パネル赤血球の選択に苦慮することが多い。そのような場合は、抗原陽性赤血球を用いて吸着される抗体と吸着上清に残る抗体に分離して、それぞれの特異性について同定検査を実施する。
- 吸着解離試験が有用な場面
 - 血漿（血清）中に複数の同種抗体が存在する場合
 - 自己抗体を吸着除去して、共存する同種抗体の有無を確認する場合

I. 不規則抗体檢查

1. 不規則抗体
2. 不規則抗体檢查

II. 交差適合試驗

1. 交差適合試驗

II. 交差適合試験

1. 交差適合試験

交差適合試験とは

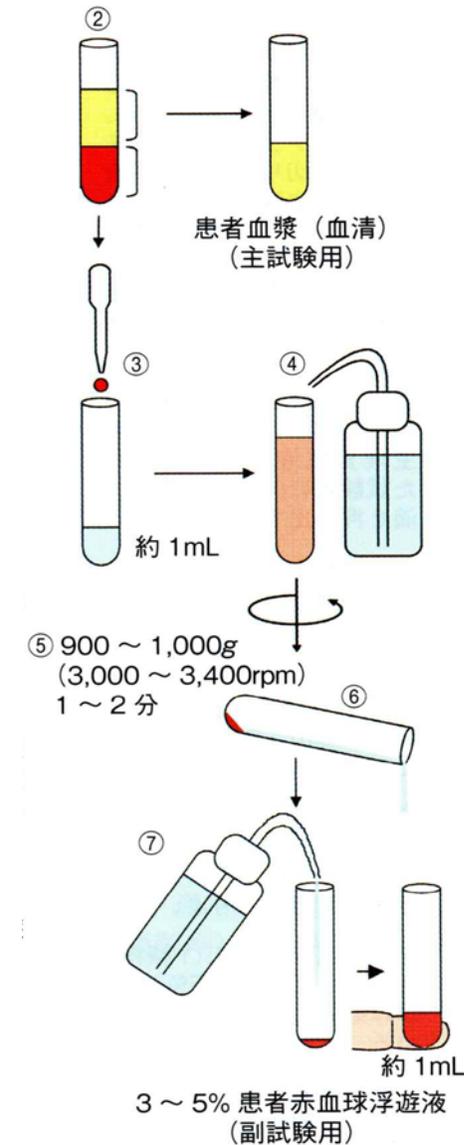
- 交差適合試験とは
- 患者血漿（血清）と供血者赤血球の組み合わせとの反応で凝集や溶血の有無を判定する主試験と、患者赤血球と供血者血漿の組み合わせとの反応を判定する副試験からなる
- 主試験は臨床的意義のある抗体を検出できる間接抗グロブリン試験を含む適正な方法で行う。間接抗グロブリン試験で用いる反応増強剤はPEGまたはLISSが望ましい。

交差適合試験の留意点

- 特別な事情のない限り患者の属する自施設内で行う。
- 交差適合試験は、間接抗グロブリン試験を含む方法で行う。
(溶血性輸血反応の原因となる臨床的意義のある抗体を検出するため)
- ABO血液型検査検体と異なる時点で採血された別検体を用いる。
- 過去3ヶ月以内に輸血歴や妊娠歴がある患者、およびこれらが不明な患者は輸血予定日から3日以内に採血した検体を用いて行う。
(新たな輸血や妊娠は同種抗体の産生を促す可能性があるため)
- 生後4か月未満の児では、原則としてABO同型の赤血球製剤で主試験を行う。

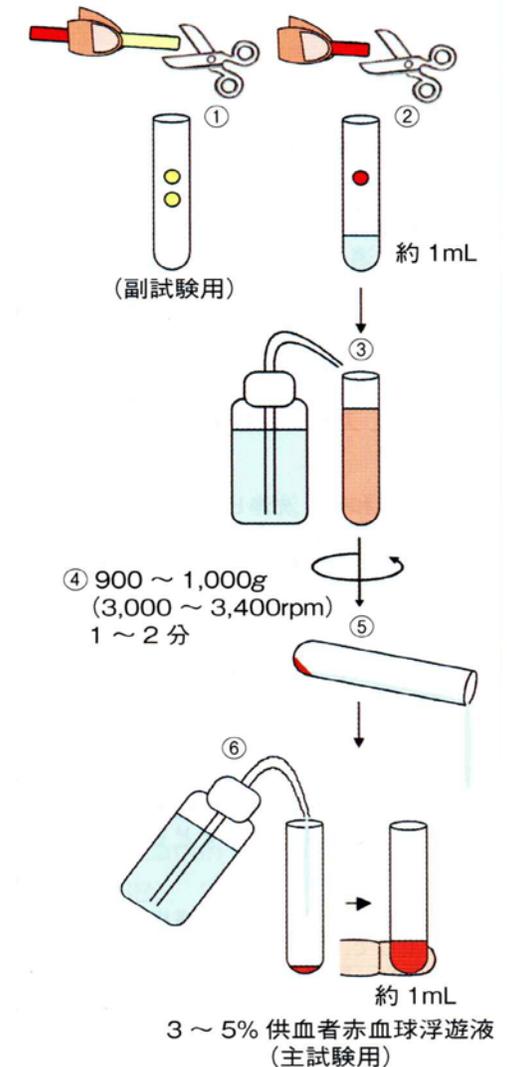
副試験用赤血球浮遊液の作成

- ① 患者検体（EDTA 血または凝固血）を遠心する
- ② 上清を分取し主試験に用いる
- ③ 患者赤血球浮遊液用試験管に生理食塩液を約 1mL 入れる
- ④ 患者赤血球沈渣を 1 滴滴下する
- ⑤ よく混和後、生理食塩液を試験管の 7～8分目まで満たす
- ⑥ 遠心する 900～1,000G(3,000～3,400rpm)で 1-2 分
- ⑦ 試験管を傾け、素早く生理食塩液を捨てる
(スポイト等を用いてもよい)
- ⑧ 生理食塩液 1mLを添加して2～5%赤血球浮遊液とする



交差適合試験の前処理

- ① 前処理：血液バッグからセグメントチューブを切り離す
- ② セグメントチューブの赤血球と血漿の境界部をハサミで切断する
- ③ 副試験用の試験管に血漿を2滴滴下する
- ④ 生理食塩液を1mL入れた試験管（赤血球浮遊液調製用）に赤血球を1滴滴下し、よく混和する
- ⑤ 洗浄ビンで生理食塩液を入れ、試験管の7～8分目まで満たす
- ⑥ 遠心する 900～1,000G(3000～3,400rpm)で1～2分
- ⑦ 赤血球沈渣が流れないように試験管を傾けて素早く生理食塩液を捨てる（スポイト等を用いてもよい）
- ⑧ 生理食塩液約1mL（一横指）を添加して2～5%赤血球浮遊液とする（主試験用赤血球浮遊液）



交差適合試験の手順

患者血漿(血清)と供血者赤血球浮遊液を加える (主試験)
供血者血清と患者赤血球浮遊液を加える

↓
遠心して判定

↓
反応増強剤を滴下し37°Cで10~15分静置
(反応増強剤を使用しない場合は37°Cで60分間静置)

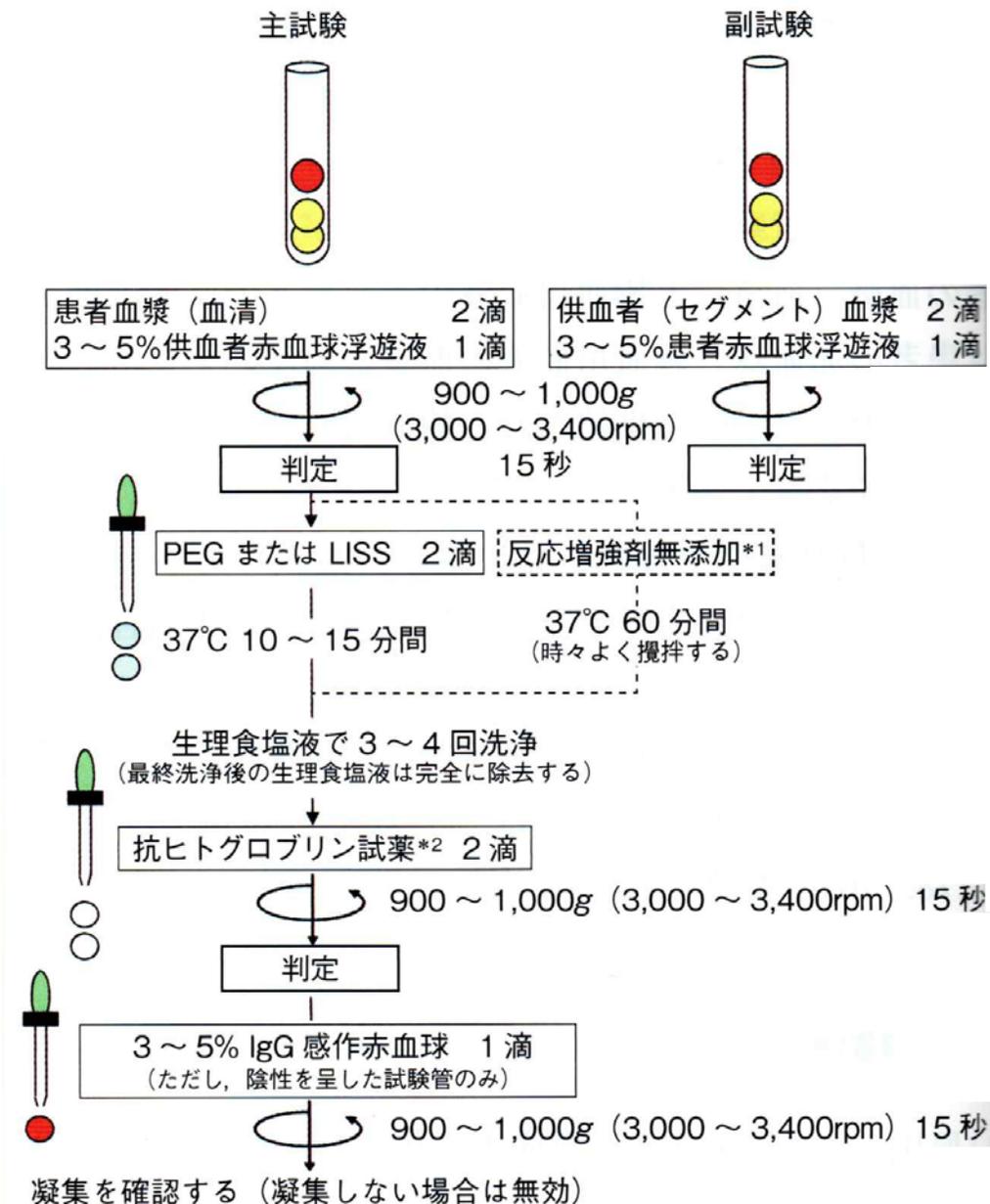
↓
生理食塩水で3~4回洗浄

↓
抗ヒトグロブリン試薬を滴下

↓
遠心して判定

↓
IgG感作赤血球を滴下

↓
凝集を確認する (凝集しない場合は無効)



交差適合試験が陽性となる要因

• 生理食塩水法で交差適合試験陽性

- 患者/輸血用血液製剤のABO型誤り
- 検体の取り違い
- 連鎖形成、寒冷凝集素

• 間接グロブリン法で交差適合試験陽性 ⇒不規則抗体スクリーニング陰性

- 低頻度抗原に対する同種抗体の存在
 - ～ 低頻度抗原はスクリーニング検査で陰性となりやすい
- 供血者赤血球の直接抗グロブリン試験陽性
- 患者と異なるABO血液型の輸血用血液製剤を使用した場合

交差適合試験の限界

- 患者および輸血用血液のRhD誤判定や不適合の検出はできない
- 患者が不規則抗体を保有し、供血者赤血球が当該抗原を有していても、結果が陰性となる場合がある
 - 供血者赤血球の当該抗原が量的効果のあるヘテロ接合体の場合
 - 不規則抗体の抗体価が低い場合
- 供血者赤血球が患者の有しない赤血球抗原を有している場合、同種抗体を産生する可能性がある
- 患者が前感作されている場合や検出感度以下の不規則抗体をすでに保有している場合、二次免疫応答によって遅発性溶血性輸血副反応を起こす可能性がある

コンピュータークロスマッチとは

- コンピュータークロスマッチとは

あらかじめ実施された検査結果や過去の検査履歴に基づき、
コンピューターを用いて適合性や安全性を確認する方法

- ABO血液型が確認していること
- RhD血液型が確定していること
- 臨床的意義のある抗体を保有していないこと
- 臨床的意義のある抗体保有歴がないこと
- 母親由来のIgG型抗A/抗Bがないこと

コンピュータークロスマッチのポイント

- コンピュータークロスマッチによって適合性や安全性が確認された場合は、交差適合試験を省略して出庫できる。ただし、以下の条件を必須とする。
 - 検査結果の不一致や血液製剤の選択が誤っている場合は警告されること
 - ABOとRhDの血液型が適切な検体で2回以上確認されていること
 - 不規則抗体スクリーニングが適切な検体で行われていること
 - 使用赤血球製剤のABO血液型のオモテ検査が施設で確認されていること
 - 生後4か月未満の児の場合、児または母親が臨床的意義のある不規則抗体を保有していないこと

コンピュータークロスマッチ

- コンピュータークロスマッチによって適合性や安全性が確認された場合は、交差適合試験を省略して出庫できる。ただし、以下の条件を必須とする。
 - 生後4か月未満の児の場合：児または母親が臨床的意義のある不規則抗体を保有していないこと、次のABO血液型ウラ検査後に、引き続き間接抗グロブリン試験を行うことで、母親由来のIgG型抗A/抗Bを保有していないことが確認されていること

ご清聴ありがとうございました