

輸血検査学実習用試薬の希釈と凝集反応について

石井 恭子*

Dilution of immunohematology laboratory practicum reagents and agglutination responses

Kyoko ISHII*

Abstract

One of the purposes of student practicums is the acquisition of skills using as many specimens as possible. Among student practicums, the reagents used in immunohematology laboratory practicums are expensive and switching to inexpensive reagents is difficult.

In this study we investigated whether it is possible to use some diluted immunohematology reagents (anti-D, anti-C, anti-c, anti-e reagents), and, if so, approximately how long they could be stored. The blood cells used were Diego A (Di^a) Cells (Ortho).

In the comparison of the storage period and three types of diluents (physiological saline and 3% and 6% albumin) for immunohematology reagents, no significant differences were observed in the reaction strength due to differences in the diluents. Each of the reagents was diluted two-folds with the three types of diluted solution, and then stored at 4°C for 5 days and frozen for 7 days. A comparison was then made with the agglutination on the day of dilution (day 0). The results indicated that there was no change in the reaction strength. This suggests that it is possible to dilute and store immunohematology reagents prior to student practicums.

Key words: Immunohematology practicum, reagent dilution, storage period, storage conditions

緒言

臨床検査技師を目指す学生にとって輸血検査の目的、手順を正しく理解し、正確に行えるようにすることは重要である。本学の輸血検査学実習では、正しい検査技術を習得するために学生自身の血液を用いて検査し、技術を確認した後、患者検体を模して調製された検体を用いて検査実習を行っている。学生実習では、出来るだけ多くの検体を用いて技術習得をすることが目的の一つであるが、輸血検査用の試薬は高価であり、かつ安価な試薬を用いる項目に変えることが難しい。試薬の希釈に加え、保存が可能であれば、学生実習の実施検体数を増やすことのみならず、教員側の準備の効率化にもつながると思われる。

検査の現場において、通常、輸血検査試薬の希釈は行われない。先行研究では、抗A、抗B血液型判定用抗体の希釈についての検討^{1),2)}や不規則抗体検査に使用する血球試薬の品質管理に関する検討³⁾は行われている。しかしながら、本検討で用いた輸血検査用試薬の希釈についての検討報告はほとんどみられない。そこで、高価な

試薬を学生実習で用いるにあたりできるだけ多くの検査を実施し、技術の習得につなげることを試みた。本検討に用いた希釈液は3種類選択した。選択理由は、生理食塩水は輸血検査で通常使用される溶媒であること、アルブミン液は、6%アルブミン液を使用してヒト由来の抗D血清などを希釈し、試薬や機器の管理、検査者の技術管理について報告している輸血検査に関する先行研究^{4),5)}を参照した。また3%濃度は6%の半分濃度として用いた。

本検討では、輸血検査用試薬の希釈が凝集反応に及ぼす影響、希釈試薬の保存条件について、希釈液3種類を用いた比較検討を試みた。

方法

1. 使用試薬等

1) 試薬：抗D, 抗C, 抗c, 抗e

試薬は、Rh式血液型キット（抗D血液型判定用抗体）オーソ[®]バイオクロン[®]抗D（ポリクローナルブレンド）（以下抗D）およびオーソ[®]バイオクロン[®]Rh式血液型

* 免疫検査学研究室, 女子栄養大学: Laboratory of Immunochemistry, Kagawa Nutrition University

判定用抗C血液型判定用抗体（以下抗C）、抗c血液型判定用抗体（以下抗c）、抗e血液型判定用抗体（以下抗e）を用いた。試薬は、有効期限内（期限まで1～2年）のものを使用した。一部冷凍保存の検討において期限を過ぎたものを使用した。使用前に原液で凝集を確認してから使用した。

2) 希釈液（3種）

滅菌生理食塩水、3%および6%アルブミン（いずれも22%ウシアルブミン液（オーソ、pH7.2, 0.08M/NaCl）を滅菌生理食塩水で希釈調製して用いた。

3) 赤血球

Reagent Red Blood Cells Diego A (Di^a) Cells (オーソ[®]ディエゴA (Di^a) 赤血球, 以下, 赤血球) を使用した。

4) 凝集の評価方法

今回の検討による凝集の評価については、輸血テクニカルセミナー2015 実技テキストVer1.2を参照し、凝集の反応強度（4+～0）をスコア値（12～0）し、合計スコアを算出し、比較した^{4), 6)}。平均スコアについては、反応強度をスコア値し、数値で示したもので、凝集が強いほどスコアは高く、凝集が弱くなるに従い、スコアは低くなる。

凝集判定は、定法⁷⁾に従い、原則として白色背景のもと、肉眼で判定した。すべての赤血球が管壁からはがれた時点で反応の強さを分類した。

5) 測定項目

測定項目は、①各希釈試薬（1:1～1:64）の希釈液3種における凝集価の測定、②2倍希釈（1:2）試薬の冷蔵保存（4℃, day 0～day 5）における凝集価測定、③2倍希釈試薬の凍結保存（-30℃, day 0～day 14）における凝集価測定とした。

2. 測定方法

測定項目①～③共通操作として、抗D、抗C、抗c、抗eを生理食塩水、3%アルブミン、6%アルブミンで1:1～1:64あるいは2倍希釈し、試験管に各試薬（100μL）と赤血球を1滴（50μL）添加し、3,000回転、15秒遠心後、セルボタン（赤血球沈査）を崩さないように静かに試験管を取り出し直ちに凝集判定した。各測定のコントロールについては、ネガティブコントロールは各希釈液+赤血球（1滴滴下）とし、ポジティブコントロールは各試薬原液+赤血球（1滴滴下）とした。

1) 各希釈試薬（1:1～1:64）の希釈液3種における凝集価の測定

上記共通操作に従い、①各希釈試薬（1:1～1:64）は希釈液3種を用いて希釈し、凝集価の測定を行い、判

定した。2)、3)については、1)の各希釈試薬（1:1～1:64）の希釈液3種における凝集価の測定で3+まで凝集のみられた2倍希釈を用いて検討した。

2) 2倍希釈試薬の冷蔵保存（4℃, day 0～day 5）における凝集価測定

上記共通操作に従い、②2倍希釈試薬の冷蔵保存（4℃, day 0～day 5）における凝集価測定を行い、判定した。2倍希釈試薬については、day 0に全ての日数分の試薬を希釈、分注後、使用時まで4℃保存とし、実験を行った。保存試薬は、室温に戻してから使用した。

3) 2倍希釈試薬の凍結保存（-30℃, day 0～day 14）における凝集価測定

上記共通操作に従い、③2倍希釈試薬の凍結保存（-30℃, day 0～day 14）における凝集価測定を行い、判定した。2倍希釈試薬については、day 0に全ての日数分の試薬を希釈、分注後、使用時まで-30℃保存とした。保存試薬は、各測定日の実施前に溶解し、実験を行った。

4) 統計解析

1)～3)のいずれも2回あるいは3回のassayの結果について、それぞれの希釈倍率につき、1回のassayで3検体実施した凝集スコアの平均値±標準偏差を算出した。統計解析は二元配置の分散分析Tukey-Kramer method テューキー・クレーマー法で行った。

結 果

1) 各試薬の希釈（1:1～1:64）による希釈液3種の凝集価の測定

初めに、各試薬の希釈（1:1～1:64）による凝集価をスコア化し、希釈液3種を比較し、以後の測定に用いる試薬の希釈倍数を検討した。各試薬の希釈液3種の凝集価は表1.1)に示した通りである。

抗Dは、いずれの希釈液においても4倍希釈で凝集2+あるいは3+を示した（凝集態度例 図1, 表1.2)）。抗

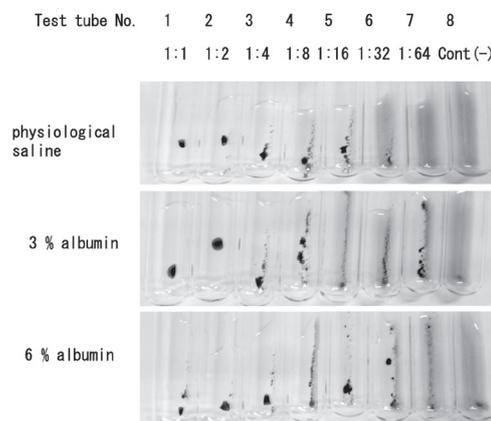


Fig. 1. Response of agglutination by three types of diluent (Example of anti-D reagent)

Anti-D showed agglutination 2+ or 3+ at 4-fold dilutions in both dilutions.

Cと抗cは、いずれの希釈液においても3回のassay(1~3)で、2倍希釈で凝集2+あるいは3+を示した。抗eは、2倍希釈で生理食塩水では凝集2+あるいは3+を示し、3%アルブミンでは1+あるいは2+, 6%アルブミンでは1+~3+を示した。

抗D, 抗C, 抗c, 抗eすべての試薬において、それぞれ希釈液の種類による凝集強度に有意な差はみられなかった。以後2), 3)の保存期間の検討に用いる各試薬については、すべての試薬において凝集3+あるいは2+の凝集が観察できた2倍希釈について検討した。

2) 2倍希釈試薬の冷蔵保存(4℃, day 0~day 5)における凝集価測定

凝集価の比較は、方法の1.使用試薬及び4)凝集の評価方法に記載したスコアを用いて比較した。平均スコアは、異なる保存日数の間での希釈液毎、各日(day 0~day 5)における凝集の強度のスコアの平均値±標準偏差を示している。

day 0からday 5の抗Dにおける生理食塩水の平均スコアは、day 0(11±1.4)からday 5(10.0±0.0)であった($p=0.91$)。3%アルブミンでは、同じく10.7から10.7±0.9($p=1.00$)、6%アルブミンでは同じく11.7±0.5から10.0($p=0.57$)であった。いずれも保存期間および希釈液間で有意差はみられなかった。

抗Cにおける生理食塩水の凝集価の平均スコアは、day 0(9.5±3.5)からday 5(4.7±6.6)であった($p=0.63$)。3%アルブミンでは、同じく10.4±2.3から5.0±7.0($p=0.54$)、6%アルブミンでは同じく11.0±1.4から9.4±2.3($p=0.99$)であった。いずれも保存期間および希釈液間で有意差はみられなかった。

抗cにおける生理食塩水の凝集価の平均スコアは、day 0(11.6±0.5)からday 3(9.8±2.1)であった($p=0.86$)。3%アルブミンでは、同じく11.7±0.5から8.7±3.5($p=0.45$)、6%アルブミンでは同じく11.7±0.5から7.5±3.5($p=0.16$)であった(図2)。いずれも保存期間および希釈液間で有意差はみられなかった。

抗eにおける生理食塩水の平均スコアは、day 0(10.0±2.8)からday 5(8.5±5.0)であった($p=1.00$)。3%ア

ルブミンでは、同じく10.0±2.8から8.2±4.5($p=1.00$)、6%アルブミンでは同じく10.0±2.8から8.0($p=1.00$)であった。いずれも保存期間および希釈液間で有意差はみられなかった。

3) 2倍希釈試薬の凍結保存(-30℃, day 0~day 14)における凝集価測定

day 0からday 14の抗Dにおける生理食塩水の凝集価の平均スコアの変動は、day 0(11.8±0.4)からday 14(11.0±1.4)であった($p=0.86$)。6%アルブミンでは同じく11.8±0.4から10.3±1.4であった($p=0.36$)。抗Dでは、3%アルブミンにおいてday 0の凝集価(11.8±0.4)に比較してday 14の凝集価が減少したものの(9.7±2.3)有意差はみられなかった($p=0.08$) (図3)。

抗Cにおける生理食塩水の凝集価の平均スコアは、day 0(9.6±2.5)からday 14(11.4±0.9)であった($p=0.77$)。3%アルブミンでは、同じく10.7±1.7から10.7±1.9($p=1.00$)、6%アルブミンでは同じく11.1±1.0から11.7±0.5であった($p=1.00$)。抗Cでは、いずれも保存期間および希釈液間で有意差はみられなかった。

抗cにおける生理食塩水の凝集価の平均スコアは、day 0(11.5±0.4)からday 14(11.0±1.4)であった($p=1.00$)。3%アルブミンでは、同じく11.1±1.0から9.9±0.2($p=0.93$)、6%アルブミンでは同じく11.3±0.7から11.7±0.5であった($p=1.00$)。抗cでは、いずれも保存期間および希釈液間で有意差はみられなかった。

Table 1. Measurement of agglutination value and aggregation judgment example in 3 types of diluted solutions of each diluent (1: 1 to 1:64)

1) Measurement of agglutination value of each diluent (1: 1 to 1:64) in 3 diluted solutions

| reagents | Physiological saline | 3% albumin | 6% albumin |
|----------|----------------------|------------|------------|
| anti-D | 50.3±3.5 | 56.7±6.0 | 54.7±3.5 |
| anti-C | 38.7±5.1 | 32.0±2.0 | 35.3±4.0 |
| anti-c | 47.7±13.4 | 48.7±20.6 | 48.3±17.6 |
| anti-e | 29.3±6.0 | 29.3±8.5 | 32.3±13.1 |

The agglutination titers of three dilutions of each reagent are shown. The statistical method used was the Tukey-Kramer method. No significant difference was observed between saline, 3% albumin, 6% albumin and the respective anti-D ($p=0.29$), anti-C ($p=0.20$), anti-c ($p=1.00$), and anti-e reagents ($p=1.00$). Numbers indicate mean score ± standard deviation.

2) Agglutination judgment example (anti-D, physiological saline)

| Test tube No. | Dilution factor | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 (cont) | Total score | Total score average |
|---------------|-----------------|----------|----------|---------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|-------------|---------------------|
| | | 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | cont | | |
| assay 1 | grade | 4+ | 3+ | 2+ | 2+ | 1+ | 1+ | w+ | 0 | 50 | 50±3.5 |
| | score | 12 | 10 | 8 | 8 | 5 | 5 | 2 | 0 | | |
| assay 2 | grade | 4+ | 3+ | 3+ | 3+ | 1+ | 1+ | w+ | 0 | 54 | |
| | score | 12 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 2 | 0 | | |
| assay 3 | grade | 4+ | 3+ | 3+ | 2+ | 1+ | w+ | 0 | 0 | 47 | |
| | score | 12 | 10 | 10 | 8 | 5 | 2 | 0 | 0 | | |
| average | score ± SD | 12.0±0.0 | 10.0±0.0 | 9.3±1.2 | 8.7±1.2* | 5.0±1.2** | 4.0±1.7** | 1.3±1.2** | 0 | | |

* : $p<0.01$, ** $p<0.001$ vs Test tube No. 1 (1:1)

The results (agglutination grade) and agglutination titer (score) of three assays for anti-D are shown. The statistical method used was the Tukey-Kramer method. A significant difference was observed in test tube No. 4 (1:8) compared to test tube No. 1 ($p<0.01$). A significant difference was observed in test tubes No.5 (1:16), 6 (1:32) and 7 (1:64) compared to test tube No.1 ($p<0.001$). All anti-D was agglutination grade 3+ up to 2-fold dilution in saline.

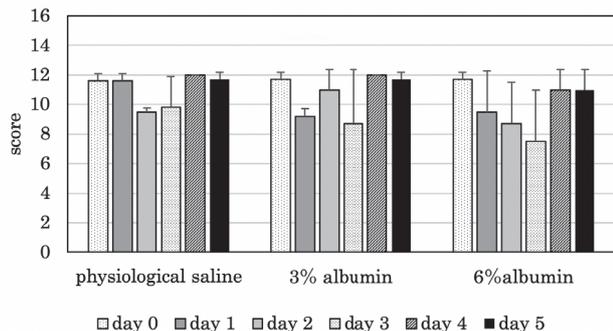


Fig. 2. Fluctuations in agglutination value (score) of 2-fold diluted reagent during refrigerated storage (anti-c)

The statistical method used was the Tukey-Kramer method. Numbers indicate mean score \pm standard deviation.

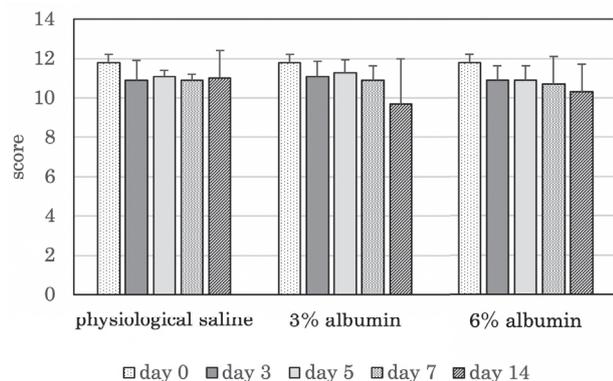


Fig. 3. Fluctuations in agglutination value (score) of 2-fold diluted reagent during cryopreservation storage (anti-D)

The statistical method used was the Tukey-Kramer method. For anti-D, the agglutination titer on day 14 was lower (9.7 ± 2.3) than that on day 0 (11.8 ± 0.4) with 3% albumin. Agglutination titer did not show significant difference until day 7. Numbers indicate mean score \pm standard deviation. The coefficient of variation (CV) of the mean values varied from day 0 (CV = 0.03) to day 14 (CV = 0.24), showing a large variation.

抗eにおける生理食塩水の凝集価の平均スコアは、day 0 (10.7 ± 2.3) から day 14 (6.2 ± 4.5) まで減少した ($p=0.83$)。3% アルブミンでは、同じく 9.8 ± 1.7 から 7.7 ± 5.2 ($p=0.98$)、6% アルブミンでは同じく 10.7 ± 2.3 から 8.2 ± 4.5 であった ($p=0.98$)。抗eでは、平均スコアが減少したものの、day 0 から day 14 までの間、いずれも保存期間および希釈液間で有意差はみられなかった。

考 察

輸血検査用試薬について、①希釈しての使用が可能か、②可能であればどの程度、どの条件で保存が可能か、について希釈液3種(生理食塩水、3%アルブミン、6%アルブミン)を用いて検討した。

本検討において、はじめに各希釈試薬(1:64まで)において希釈液3種を比較したところ、希釈液の違いによる反応強度に有意差はみられなかった。表1の抗Dの結果に示した通り、原液(1:1)に比較して2倍希釈までは反応強度3+を示した。4倍希釈では2+~3+、8倍希釈(1:8)では2+~3+を示し、原液に比較して反応強度(スコア)は有意な低値($p<0.01$)を示した。図1に示した反応態度では、2倍希釈において原液(1:1)

と同様の凝集塊がみられた。このことから、冷蔵及び冷凍保存の期間の検討はそれぞれの試薬を2倍希釈とすることとした。

各試薬を希釈液3種でそれぞれ2倍希釈した場合、4℃保存で5日間、凍結で7日間は凝集の反応強度に変化が見られないことが示唆された。しかしながら、本来なら保存日数を経るに従い、凝集は弱くなると推測したものの、図2で示したように必ずしも日数と凝集の強さに相関はみられず、結果にはばらつきがみられた。この要因として術者の技術不足も挙げられるかもしれない。奥嶋は、血球凝集の判定を的手法で行う場合、試験管の振り方、流し方、凝集の強さの分類など、結果判定の再現性に影響する因子は多数あると述べている。このことは、個人差が出やすいことにつながり、検査者は知識と熟練が必要であり、標準化のためには手技と凝集判定の目合わせが必要であると述べている⁴⁾。

試薬と赤血球の結合が強い場合、しばしば遠心後の凝集塊が試験管底に張り付き、この凝集塊を管底からはがす作業操作中に崩れてしまうこともあった。この凝集塊については、凝集したまま崩れないように試験管を傾け、管底からはがれた時点での凝集塊の反応強度を判定するが、慣れないと難しい操作である。本検討で凝集判定に用いた遠心機は学生実習と同じものを使用したが、学生実習においても同様の現象が起こることが推測された。この検討を通して、輸血検査における凝集塊の判定操作は注意を要する重要な操作であることが確認できた。

2倍希釈の試薬を -30°C で凍結保存した場合については、抗D以外の抗C、抗c、抗eについては、day 0 から day 14 の間で希釈液間、希釈液とも有意差はみられなかった。従って、 -30°C 保存で14日間は保存が可能であることが示唆された。抗Dについては、3%アルブミンで希釈したときのday 14の凝集価がday 0に比較して低値を示したものの、有意差はみられなかった。抗D以外の希釈試薬についても、assay間の標準偏差が大きかったため、有意差がみられなかった可能性も示唆された。抗eについても、ばらつきが大きかった。結果のばらつきにより有意差がみられなかったことは、冷蔵保存にける検討についても同様であると推測された。

今回の検討では、冷蔵保存の検討で用いた抗cや凍結保存の検討で用いた抗eのように、結果にばらつきがみられ、それぞれの試薬の特性による結果の差異が生じる可能性も示唆された。一方で、不規則抗体の精度管理のため、抗原の保存による変化について検討した重田らの報告³⁾では、スクリーニング血球に含まれる抗原の強さにより、不規則抗体の陽性率が左右されることを述べている。赤血球型検査ガイドラインでは、少なくとも2本の不規則抗体スクリーニング赤血球を1組として用いること、抗原C、c、e等を測定する際はホモ接合体の赤血球を含むことが望ましい、とされている⁸⁾。今回の検討で使用した赤血球は、抗原の有無を優先し、また同時に数種の試薬、希釈液を検討したことからホモヘテロの別を

分けずに用いた。本検討の目的は輸血検査用抗D, 抗C, 抗c, 抗e各試薬を希釈して用いることが可能かどうかではあったが、希釈した試薬のばらつきは赤血球の影響も大きいのではないかと考えられた。このことから、輸血検査用試薬の検討を行う際には、使用する血球についても考慮する必要があることが示唆された。

本来、輸血検査試薬は希釈だけでなく、凍結、溶解しての使用も行われたい。特に、検査室において試薬の凝集および血球試薬の凝集力を記録し、管理することは、正確な結果を出すために重要な精度管理である。奥嶋は、輸血検査の精度管理についての重要性を述べる中で、検査試薬の精度管理について示している⁴⁾。すなわち、反応性の確認は検査日ごと、検体ごと、ロット変更時など必要に応じて行われなければならない。さらに陽性対照として希釈調製した試薬などは劣化しやすく、毎日のチェックが必要になる、と述べている。本来であれば本検討でも新たに試薬を購入し、同じロット、同じ使用期限の試薬を使うべきであると思われた。しかしながら、新たな試薬の購入は、今回の目的でもある高価な試薬の費用を抑えることができなくなることを考慮し、在庫試薬を用いて検討を行った。

本検討では、学生実習での使用を念頭に輸血用試薬の希釈と4℃あるいは凍結-30℃保存の可能性の有無を確認した。その結果、試薬は希釈と保存が可能であることが得られた。小野寺ら⁹⁾は、モノクローナル抗体の力価試験において、抗C, 抗c, 抗E, 抗eを用い、これらに対する抗原陽性血球であるホモ接合体、ヘテロ接合体を用いて凝集価を測定している。その結果、これらの試薬においてホモ接合体で128~512倍まで、ヘテロ接合体で64~256倍まで凝集がみられたことを報告している。本来の測定では希釈して用いるべきではないものの、学生実習のように多くの検査を実施する場合には希釈試薬を用いても可能であると示唆された。

今後は、先述した赤血球試薬の選択も含め、2倍希釈以上の試薬の力価についての検討やさらに保存期間を延長した場合についての検討、さらに結果のばらつきについての解消が必要である。今回血球が入手できなかった抗Eについては、使用したDi^a (ディエゴ) 赤血球のアンチグラム (Antigram[®] Antigen Profile) に抗原+が得られないものあり、すべてのデータを取得することができなかったため、今回の結果からは除外した。これについても今後検討する必要があると思われた。

要 約

本検討では、学生実習での使用を念頭に輸血検査用試薬の希釈と4℃あるいは凍結-30℃保存の可能性の有無を確認した。その結果、希釈液3種で2倍希釈した場合、4℃で5日間、-30℃保存で7日間は凝集の反応強度に変化がみられないことが示唆された。このことから、学生実習の際に実習前に希釈、保存が可能であり準備の効率化に役立つこと、学生が手技を覚えるために、より多くの検体検査を実施することができると考えられた。

謝 辞

本資料の要旨は、第13回日本臨床検査学教育学会学術大会にて発表(2018年8月, 札幌)された内容に基づいたものである。本実験を進めるにあたりご協力いただいた本学免疫検査学研究室2018年度卒業研究生渡邊晶子氏に感謝申し上げます。

参考文献

- 堀 勇二, 水谷聡江, 中出 亮, 富田忠夫: 抗A, 抗B血液型判定用抗体の評価. 機器・試薬, **19** (5), 745-755 (1996)
- 木村恵子, 中出 亮, 富田忠夫: 抗Aおよび抗B血液型判定用モノクローナル抗体の評価-ガンマクロン抗A, ガンマクロン抗Bについて-. 機器・試薬, **20** (6), 875-879 (1997)
- 重田勝義, 川田典子, 飯島雅子, 奥田 誠, 加藤 禎, 芹沢美保, 月本一郎: 不規則抗体検査に使用する血球試薬の品質管理に関する検討. 医学検査, **41**, 1730-1733 (1992)
- 奥嶋博美: 輸血検査の精度管理-検査用試薬・結果判定法の精度管理. Medical Technology, **37** (9), 975-978 (2009)
- 寺内純一: 輸血管理-輸血用血液製剤の保冷庫の管理, 試薬・機器の管理. 医学検査, **54** (5), 735-743 (2005)
- 一般社団法人 日本輸血・細胞治療学会, 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会, 輸血テクニカルセミナー 2015 実技テキストVer1.2, 6 (2016)
- 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会 (監修), JAMT技術教本シリーズ 輸血・移植検査技術教本, 24-25, 丸善出版, 東京 (2016)
- 奥田 誠, 石丸 健, 内川 誠, 梶原道子他: 赤血球型検査(赤血球系検査)ガイドライン(改訂第2版), Japanese Journal of Transfusion and cell Therapy, **62** (6), 651-653 (2016)
- 小野寺孝行, 井上 進, 野本喜代, 村田 愿: 抗C, 抗c, 抗Eおよび抗e血液型判定用モノクローナル抗体の評価. 機器・試薬, **20** (3), 463-475 (1997)