自動血球洗浄機の使用による抗グロブリン試験偽陰性反応に 対する改良方法の検討

神白 和正 小沢 直宏 矢澤百合香 菊地寿美子
武藤 美雪 山本 恵美 清水 勝
都立駒込病院輸血科

(昭和60年11月1日受付)

OVER-FLOW CELL-WASHING METHOD TO DECREASE FALSE NEGATIVE PHENOMENON IN ANTIGLOBULIN TESTS BY AUTOMATIC CELL WASHERS

Kazumasa Kajiro, Naohiro Ozawa, Yurika Yazawa, Sumiko Kikuchi,
Miyuki Mutoh, Emi Yamamoto and Masaru Shimizu
Blood Transfusion Division, Tokyo Metropolitan Komagome Hospital

Recently antiglobulin tests (AGT) have been prevalent in screening and identification of antibodies in sera or in compatibility tests. However, false negative phenomenon in AGT, which are cumbersome and wasteful of time and money, occurred in 4.2% (388/9,217 samples tested) with automatic cell washers in use, but not with manual 4 times washing procedures. When the test tubes were overflowed with massive additional saline before spin and decant cycles using automatic cell washers, the incidences of false negative phenomenon were remarkably reduced to only 0.02% (5/20,153 samples tested) without any loss of red cells.

When saline was discarded along the outlets opposite to the inlets of saline on the inner-surfaces of the test tubes, false negative phenomenon occurred easily to be 9.4% (18/192 samples tested). On the contrary, when the outlets of saline were just the same routes as their inlets, no false negative phenomenon were observed at all.

Overflowing additions of saline before their waste are easy to perform and result in washing the whole inner-surfaces of the test tubes much more cleanly, so that false negative phenomenon are decreased remarkably.

はじめに

輸血検査における抗グロブリン試験は、自動血球洗浄機の普及に伴って、抗体スクリーニング、抗体の同定あるいは交差適合試験などに広く応用されるようになってきた。わが国ではブロメリン法が広く普及しているが、ブロメリン法では検出され難く、抗グロブリン法のみで検出される抗体による輸血副作用やブロメリン非特異反応などが問題となるからである。

ところで、抗グロブリン試験に際しての血球の洗浄に自動血球洗浄機を用いた場合には、洗浄効果不良による偽陰性反応が時として認められるこ

とは煩雑な問題である。われわれはこの洗浄方法に若干の改良を加えることにより良好な結果を得たので報告する。

対 象

検体は予備試験として用いた192例の健常人血清と日常業務での抗グロブリン試験の検体29,370例である。

自動血球洗浄機としては日立 MC-300(以下、日立と略)、SORVAL CW-1(以下、SORVAL と略)と DADE DAC(以下、DADE と略)の3機種を用い、検査用試験管は10×75mm のものを使用した。

なお洗浄効果の確認は、抗グロブリン試験の判定後に10倍希釈抗D血清を感作した血球を加えて行った。

予備試験

I) 被検血清の滴下壁面と生食水の注入、排出壁面の違いによる偽陰性反応の出現率について検討した。この血清の滴下を管壁面の上部からつたわらせた4系列の試験管を用意し、この血清の滴下壁面と反対側の壁面から生食水の注入、排出を行った系では、192検体中18検体(9.4%)に偽陰性反応が認められたが、この血清の滴下壁面と同一壁面から生食水の注入、排出を行った系では、192検体中偽陰性反応は1検体も認められなかった(表1-1)。また、この血清の滴下壁面と反対側の壁面から生食水の注入、排出を行った2系列について、デカント壁面から壁面をつたわらせて抗グロブリン血清を添加した系では、192検体中2検体(1%)に偽陰性反応が認められたが、デカント壁面の反対側の壁面をつたわらせて抗グロブリン血清を添加した系では、192検体中146検体(76%)に偽陰性反応が認められた(表1-2)。

II) 被検血清の滴下方法別に偽陰性反応の出現を観察した(表2)。この血清を壁面につけずに管底に滴下した場合、DADE(10mmアダプター無)では、192検体中14検体(7.3%)に偽陰性反応が認められ、またこの血清を日常の滴下の同様無作為に滴下した場合でも796検体中86検体(10.9%)に偽陰性反応が認められ、両法の間には有意差は認められなかった。

III) 自動血球洗浄機での通常の4回洗浄法では、1回の洗浄手順は生食水の注入、遠心沈殿、生食水の排出というように行われ、この場合偽陰性反応は192検体中4検体(2.1%)に認められた

表1-1 被検血清の滴下壁面と生食水の注入・排出壁面の違いによる偽陰性反応の出現率

洗 浄 方 法	偽陰性反応の出現率
この血清滴下の反対壁面から生食水の注入・排出を行った場合	18/192 (9.38%)
この血清の滴下面から生食水の注入・排出を行った場合	0/192 (0%)

被検血清の滴下は管壁面をつたわらせて

表1-2 被検血清滴下の反対壁面から生食水の注入・排出を行った場合

抗グロブリン血清の滴下	偽陰性反応の出現率
生食水の注入・排出壁面と同一壁面から行った場合	2/192 (1%)
生食水の注入・排出壁面と反対壁面から行った場合	146/192 (76%)

表2 被検血清の滴下方法別に見た偽陰性反応の出現率

この血清の滴下方法	偽陰性反応の出現率	
管壁面につけずに滴下	14/192 (7.29%)	p>0.05
無作為に滴下	86/796 (10.86%)	

が、洗浄手順の途中の遠心沈殿後の排液前に、再び生食水の注入を行って一部の生食水を試験管より横溢させてから排液する方法(Over-Flow法; 以下OF法と略)では、192検体中偽陰性反応は1検体も認められなかった(表3)。

日常検査での検討

通常の4回洗浄法とOF法による偽陰性反応の出現率を機種別に検討した。

通常業務でのOF法の方法としては、日立は毎回の洗浄ごとにOver-Flowして3回の洗浄を行ない、SORVALとDADEは1回目の洗浄時のみ

表3 洗浄方法と偽陰性反応の出現率

洗浄方法	1 回 の 洗 浄 手 順	偽陰性反応の出現率
4回洗浄法	生食水の注入⇒遠心沈殿—————⇒生食水の排出	4/192 (2.1%)
OF*法	生食水の注入⇒遠心沈殿⇒生食水の注入⇒生食水の排出	0/192 (0%)

*Over-Flow

Over-Flow を行ったあと、通常の洗浄を2回行った。

その結果、通常の4回洗浄法とOF法との偽陰性反応の出現率は(表4)、日立ではそれぞれ4,493検体中160検体から、13,562検体中3検体に、また、SORVALではそれぞれ3,428検体中125検体から、4,817検体中1検体へとそれぞれ約3.6%から0.02%に著減した。DADEでは10mm用アダプターを付けずに使用した場合の、その出現率はそれぞれ796検体中86検体(10.9%)が、612検体中1検体(0.16%)に、アダプターを付けて使用した場合には、それぞれ500検体中19検体(3.8%)から1,162検体で0%へと激減した。各機種の合計でも4.2%から0.02%へと4回洗浄法に比して、OF法では有意に偽陰性反応は著しく減少した。

OF法で偽陰性反応の認められた5例についてその原因を検討してみたところ、日立の3例は試験管ローター部の同一部位にみられたサビによるデカント不良、SORVALの1例はディストリビューターの目づまり、DADEについては原因不明であった。

表4 機種別による偽陰性反応の出現率

機 種	4 回洗浄法	OF*法
日 立 MC-300	160/4493 (3.56%)	3/13562 (0.02%)
SORVAL cw-1	123/3428 (3.59%)	1/ 4817 (0.02%)
DADE DAC (アダプター 無)	86/ 796** (10.86%)	1/ 612 (0.16%)
DADE DAC (アダプター 有)	19/ 500** (3.80%)	0/ 1162 (0 %)
合 計	388/9217 (4.21%)	5/20153 (0.02%)

*Over-Flow
**p<0.01

抗グロブリン血清の中和試験

洗浄不良による偽陰性反応の生じる原因についての検討を、4社の抗グロブリン血清を用いた中和試験により行った(表5)。IgG 15.2mg/mlの原血清を8,000倍まで倍々希釈した血清中には、1.9μg/mlのIgG量が含まれていることになる。この希釈血清では抗グロブリン血清の抑制は認められなかった。しかし、3.7μg/ml(4,000倍希釈)のIgGでは、2社(O-1, G-3)の抗グロブリン血清

表5 抗グロブリン血清の中和試験

被検血清 希釈倍数	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	生食水 対 照
IgG 量 (μg/ml)	59.4	29.7	14.8	7.4	3.7	1.9	0.9	0.5	0.0
抗血 グ ロ ブ リ ン 清	0-1	—	—	±	±	3+	4+	4+	4+
	D-2	—	—	±	+ ^w	4+	4+	4+	4+
	G-3	—	—	—	—	2+	4+	4+	4+
	T-4	—	—	±	2+	4+	4+	4+	4+

方法：被 検 清 100μl } 37℃60min. 5%感作血球 3400rpm15sec. 判
抗グロブリン血清 100μl } 100μl 定

表6 抗グロブリン血清の中和試験

被検血清 希釈倍数	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	生食水 対 照
IgG 量 (μg/ml)	59.4	29.7	14.8	7.4	3.7	1.9	0.9	0.5	0.0
中和後の抗 IgG 活性(PHA 価)	< 2	< 2	< 2	1	64	256	512	1024	1024
抗グロブリン血 清の中和	—	—	—	±	3+	4+	4+	4+	4+

に抑制が認められ、 $7.4\mu\text{g/ml}$ (2,000倍希釈) の IgG で完全に中和されたが、他の2社 (D-2, T-4) の抗グロブリン血清では $14.8\mu\text{g/ml}$ (1,000倍希釈) まで中和されなかった。

われわれの日常使用している抗グロブリン血清について、中和後の抗 IgG 活性を PHA 法で検討した (表6)。希釈血清の IgG が $0.9\mu\text{g/ml}$ で活性の抑制がはじまり、 $7.4\mu\text{g/ml}$ の IgG でもわずかながら活性が認められた。

次に、洗浄回数別に洗浄液中の IgG 残存量を R-PHA 法で検討した (表7)。1回目の洗浄液中には、通常の4回洗浄法、毎回の OF 法ともに $256\mu\text{g/ml}$ 以上の IgG 残存量を認めたが、2回目ではそれぞれ $4\sim 8\mu\text{g/ml}$ と $2\mu\text{g/ml}$ 、3回目ではそれぞれ $0.13\mu\text{g/ml}$ 以下であり、3回洗浄後には抗グロブリン血清の抑制、中和に影響を及ぼすほどの IgG 量は認められなかった。

さらに抗グロブリン試験実施後の上清中の IgG 残存量を R-PHA 法により測定した (表8)。感作血球との反応が2+と抗グロブリン血清の抑制、中和が認められなかった場合の IgG 量は $0.3\mu\text{g/ml}$ 以下であり、+と抗グロブリン血清の抑制がみられた場合には $2.5\sim 10\mu\text{g/ml}$ の IgG 量が残

存し、感作血球との反応が陰性の場合には、IgG 量が $10\sim 20\mu\text{g/ml}$ で、抗グロブリン血清の中和試験の結果と同様な IgG 残存量を認めた。

考 察

抗グロブリン試験における偽陰性反応¹⁾には、使用する血球、血清と抗グロブリン血清等の不適当な保存による品質の劣下によるもの、抗凝固剤使用による補体結合性抗体の非活性によるもの、反応温度と反応時間の不適切によるもの、血球血清の混合比の問題によるものなどの原因のほか、血清中の IgG による抗グロブリン血清の中和²⁾³⁾、血清による抗グロブリン血清の汚染などが挙げられる。

われわれは、抗グロブリン試験の洗浄に自動血球洗浄機を使用した場合、抗グロブリン試験終了後の感作血球に凝集の認められない現象が、ランダムに出現することから、抗グロブリン血清が残存血清成分中の IgG で中和されることにより偽陰性反応が出現すると考え、その原因の究明と対策方法について検討を行った。

用手法では偽陰性反応が殆ど認められないが、洗浄中の血球の損失により抗グロブリン血清添加後の判定がしにくくなることから、洗浄中の血球の損失を考慮した血球浮遊液の濃度で試験することがある。しかしこれは血清対血球の最適比が得られず良策ではない。

血動血球洗浄機による洗浄法では、デカント量の調節により効率よく洗浄することができる。しかしながら偽陰性反応が3~4%に出現することが問題となる。

両方法の1回の洗浄手順を比較すると、用手法では生食水の注入後、転倒混和し遠心沈殿後試験管を転倒して排液を行うのに対して、自動洗浄法では、生食水の注入後遠心沈殿し、注入壁面から排液が行われる。この際試験管は試験管ローター内で殆んど動かないことから同一壁面での洗浄が行われていることになる。そこで、被検血清の滴下方法による洗浄効果をみると、試験管の上部から壁面をつたわらせた場合の洗浄では、この血清の滴下面から生食水の注入、排出を行った場合では偽陰性反応は認められなかったが、この血清の滴

表7 洗浄回数別にみた洗浄液中の IgG 残存量

		数字： $\mu\text{g/ml}$			
機種	洗浄回数	1回	2回	3回	4回
DADE DAC (通常の4回洗浄)		>256	4~8	<0.13	<0.13
日立 MC-300 (毎回 Over-Flow)		>256	2	<0.13	—

測定方法：HI 法
検出感度： $0.13\mu\text{g/ml}$

表8 抗グロブリン試験実施後の上清中の IgG 残存量

感作血球との反応	IgG 残存量 ($\mu\text{g/ml}$)
2+	<0.3
+	2.5~10
—	10~20

測定方法：R-PHA 法
検出感度： $0.16\mu\text{g/ml}$

下壁面と反対側から生食水の注入、排出を行った場合では9.4%に偽陰性反応が認められた。またこの血清の滴下壁面と反対壁面から生食水の注入、排出を行った場合でも、抗グロブリン血清をこの血清の滴下壁面からつたわらせて添加した場合は76%に偽陰性反応が認められ、この血清の滴下壁面と反対側、すなわち生食水の注入、排出面から抗グロブリン血清を壁面をつたわらせて添加した場合は、1%と偽陰性反応の出現率に大差が認められた。このことは血清の付着した壁面が生食水の注入、排出壁面と反対側になるように試験管ローターにセットされて洗浄が繰り返され、抗グロブリン血清が付着壁面をつたわらせて添加された場合には、洗浄不十分な部位が残るために、その部位に残存する血清成分中のIgGによって抗グロブリン血清が中和されてしまい、偽陰性反応が出現するものと考えられる。

またこの血清を壁面に付けずに滴下した場合は、無作為に滴下した場合に比して偽陰性反応の出現率がやや低いものの有意差はなかった。このことは1回目の生食水の注入時にこの血清が壁面をはい上がり、生食水の注入部位より上部に付着し以後3回の洗浄によってもこの血清の付着壁面が洗浄されないことから偽陰性反応が出現するものと考えられる。

そこで通常の4回洗浄法の1回の洗浄手順の遠心沈殿後に再び生食水を注入しOver-Flowさせて全管壁面を生食水で洗浄することを考案し試みたところ、この血清の滴下壁面に影響されことなく血球の洗浄が行えることが明らかとなった。

4社の抗グロブリン血清に対する残存血清中のIgGによる抑制、中和は、IgG量で3.7~7.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で認められるが、1.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では抑制は認められず、血清を4,000倍以上に希釈すると抗グロブリン血清に影響しないIgG量になる。しかしながら、PHA法により抗IgG活性をみると、0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG量でもわずかながら抗グロブリン血清の抑制が認められたことから、10,000倍以上の血清の希釈が望ましいと考えられる。通常われわれの使用している試験管では2~2.5mlの生食水を注入し、3回洗浄後の血清希釈倍数は8,000倍以上

となることから充分な希釈が行われているはずであるが、それにもかかわらず偽陰性反応がみられることが問題となる。

そこで、洗浄回数別の通常の4回洗浄法と毎回のOF法との洗浄液中のIgG残存量をみると、いずれも3回目の洗浄液中には抗グロブリン血清の抑制、中和に影響を及ぼすほどのIgG量は残存していなかった。

しかしながら、4回洗浄法で偽陰性反応のみられた上清中には10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のIgG量の残存が認められた。このことは被検血清の希釈以外にこの血清の滴下壁面への付着が偽陰性反応の出現する原因であることを示しているものと考えられる。つまり、偽陰性反応を防ぐためには試験管の全内壁面を十分量の生食水で洗浄することが必要であるといえる。その点、OF法は目下のところ最も手取り早い洗浄方法といえるであろう。

ところで、OF法での問題点は、洗浄中のOver-Flowによる生食水の飛散がサビの原因となることである。OF法での偽陰性反応の5例のうち3例(日立)では、試験管ローター部分のサビによるデカント不良によるものであったことから、サビ対策が重要と考えられる。

これらのことから、自動血球洗浄機の使用¹⁴⁾に際しては、偽陰性反応がランダムに出現することから、洗浄した全ての検体について抗グロブリン試験判定後に感作血球による洗浄効果の管理と、定期的なメンテナンスが必須なことであるといえる。

結 論

自動血球洗浄機を使用した通常の4回洗浄法に比して、OF法では偽陰性反応の出現率を4.2%から0.02%へと著しく減少させることができた。その理由としては、このOF法により血球を損失することなく、洗浄手順の遠心沈殿後に再び生食水を注入し、生食水を横溢することで、用手法と同様に全管壁面の洗浄が行われることによるものと考えられた。

以上のことから自動血球洗浄機の洗浄手順にOver-Flow法の導入と生食水の飛散による洗浄機内部のサビ予防対策について早期対応が望まれ

る。

文 献

- 1) Technical Manual, 8th ed., American Association of Blood Banks, Washington D.C., 1981.
 - 2) Issitt, P.D. and Isitt, C.H.: Applied blood group serology. 3rd ed., B.C.A., 42-43, 1981.
 - 3) Mollison, P.L.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 7th Blackwell Sci. Publ., Oxford, 444-445, 1981.
 - 4) 内川 誠, 遠山 博: 自動血球洗浄装置. 検査と技術, 10: 535-538, 1982.
-