

研究

「ガンマクローン抗 IgG」の基礎的検討

土手内 靖, 尾崎牧子, 西山記子, 長谷部 淳, 谷松智子, 西山政孝

松山赤十字病院 検査部

Basic study of 'Gamma-clone Anti-IgG' reagent for transfusion test

要旨

IgM 型のモノクローナル抗グロブリン試薬である「ガンマクローン抗 IgG」(モノクロ抗 IgG) の試験管法における検出感度, および操作中の放置時間の影響を IgG 型のポリクローナル抗グロブリン試薬「オーソ 抗ヒト IgG 血清 (ウサギ)」(ポリクロ抗 IgG) と比較した. モノクロ抗 IgG はポリクロ抗 IgG に比べ, DAT では半数例の反応強度が増強し, 低力価検体の被凝集価は 2~3 管増強した. IAT では冷式抗体の検出感度は同等であったが, 温式抗体の反応強度が若干増強し, 特に HTLA 抗体の力価は 2~3 管増強した. 以上, モノクロ抗 IgG は効果的かつ効率的な検査体制に貢献しうると考えられた. しかし, 抗グロブリン試薬添加後は時間とともに凝集の減弱が進行したことから, 速やかに遠心する必要がある.

Yasushi Doteuchi, et al : ISSN 1343-2311 Nisseki Kensa 48 : 43—46,2015(2014.12.25 受理)

KEYWORDS

抗グロブリン試薬, モノクローナル抗体,
間接抗グロブリン試験, 直接抗グロブリン試験

はじめに

1975 年に Kohler と Milstein が細胞融合法を報告して以降, 多くのモノクローナル (以下モノクロ) 抗体が開発されてきた. 輸血検査分野においても抗 A, 抗 B, 抗 D をはじめ多くの抗体試薬がポリクローナル (以下ポリクロ) 抗体からモノクロ抗体に移行している. 「ガンマクローン抗 IgG」(株式会社イムコア, 以下モノクロ抗 IgG) は直接抗グロブリン試験 direct anti globulin test (DAT), および間接抗グロブリン試験 indirect anti globulin test (IAT) の検出感度の向上と非特異反応の減少を目的に開発された IgM 型のモノクロ抗グロブリン試薬である. 今回, 我々は試験管法による DAT, IAT において, モノクロ抗 IgG を IgG 型のポリクロ抗グロブリン試薬である「オーソ抗ヒト IgG 血清 (ウサギ)」(Ortho-Clinical Diagnostics

株式会社, 以下ポリクロ抗 IgG) と比較検討したので報告する.

【材料および方法】

1. 測定試薬

抗グロブリン試薬はモノクロ抗 IgG, ポリクロ抗 IgG を使用した. 反応増強剤の polyethylene glycol (PEG) はガンマ PeG (株式会社イムコア), 低イオン強度溶液 low-ionic-strength solution (LISS) はオーソエンハンスメント・ソリューション (Ortho-Clinical Diagnostics 株式会社) を, 4%赤血球試薬は Bio Vue Screen J (Ortho-Clinical Diagnostics 株式会社) を使用した.

2. 検体

当院の採血当日の患者検体 DAT32例, IAT 40例 (温式抗体 23例, 冷式抗体 17例) を対象とした.

3. 方法

DAT, IAT について, モノクロ抗 IgG を用いた測定 (モノクロ法), およびポリクロ抗 IgG を用いた測定 (ポリクロ法) を以下の条件で実施し, 2 法の検出感度 (検出数, 反応強度), および操作中の放置時間の影響を比較した. 反応強度は (W+) を 0.5 ポイント, (1+) を 1 ポイントとした.

1) DAT

被検赤血球の 3% 浮遊液を作製し, 試験管に 50 μL 分注, 3 回洗浄後, 抗グロブリン試薬を 100 μL 分注し, 3400rpm 15 秒間遠心, 判定した. 被凝集価の測定は抗グロブリン試薬を生理食塩液にて 2 倍連続希釈し, その希釈液を用いて同様に行った.

2) IAT

試験管に被検血清または血漿を 100 μL, 4% 赤血球試薬 50 μL, 反応増強剤 100 μL を分注, 37°C 15 分間加温後, 3 回洗浄, 抗グロブリン試薬を 100 μL 分注し, 3400rpm 15 秒間遠心, 判定した. 反応増強剤には PEG を使用し, ゲル化がみられた場合には LISS に変更, もしくは反応増強剤無添加で, 37°C 60 分間加温する生理食塩液 (Sal)-IAT を実施した. 抗体価の測定は被検血清または血漿を生理食塩液にて 2 倍連続希釈し, その希釈液を用いて Sal-IAT を実施した.

3) 操作中放置時間の検討

DAT はモノクロ法, ポリクロ法ともに陽性 5 例 (強陽性 1 例, 中等度陽性 1 例, 弱陽性 3 例), IAT は温式抗体 5 例 (抗 Fy^b2 例, 抗 E, 抗 Jk^b, 抗 Di^a 各 1 例) を用いて, ① 赤血球洗浄後抗 IgG 試薬添加まで, ② 抗 IgG 試薬添加後遠心まで, および③ 遠心後判定までの 3 点において操作を①, ③は 0, 5, 15

分間, ②は 0, 1, 2, 5 分間中断したのち続行し, 操作中の放置時間が測定結果に与える影響を検討した.

【成績】

1. 検出感度の比較

1) DAT

患者検体 32 例は両法とも陰性 17 例, いずれかの方法で陽性 15 例であった (Table 1-A). 陽性例のうち 2 例はモノクロ法でのみ陽性であった. 残り 13 例は両法で陽性であり, 反応

Table 1 反応強度の比較

(数字は例数)

A		32例						
		ポリクロ法						
		4+	3+	2+	1+	w+	0	Total
モノクロ法	4+		1					1
	3+		1					1
	2+			1	3	1		5
	1+				4	1	2	7
	w+					1		1
	0						17	17
	Total		0	2	1	7	3	19

B		23例						
		ポリクロ法						
		4+	3+	2+	1+	w+	0	Total
モノクロ法	4+	C,E						2
	3+		E,E,Fy ^b Di ^a ,Di ^a ,Di ^a	E,Jk ^b ,Di ^a	Jra			11
	2+			e,Le ^a Di ^a ,Di ^a ,Jra				5
	1+				E,Le ^a Le ^a ,Fy ^b			4
	w+					Jk ^a		1
	0							0
	Total		2	7	8	5	1	0

C		17例						
		ポリクロ法						
		4+	3+	2+	1+	w+	0	Total
モノクロ法	4+	M						1
	3+			Le ^a				1
	2+			Le ^a				1
	1+				Le ^a ,Le ^a ,Le ^b			3
	w+							0
	0				M		Le ^a ,Le ^a ,Le ^b ,Le ^b ,Le ^b MP ₁ ,P ₁ P ₁ ,P ₁	11
	Total		1	0	2	4	0	10

A. DAT, B. IAT (温式抗体), C. IAT (冷式抗体)

DAT : direct anti globulin test (直接抗グロブリン試験),

IAT : indirect anti globulin test (間接抗グロブリン試験)

強度はモノクロ法がポリクロ法に比べ、同一7例，増強(+0.5~+1.5) 6例であり，半数近くで増強傾向を認めた。また，被凝集価を測定した4例中3例でモノクロ法が高く，特に低力価の2例(検体1,2)では2~3管の増強を認めた(Table 2-A)。

2) IAT

温式抗体23例はすべて両法とも陽性であった(Table 1-B)。その反応強度はモノクロ法がポリクロ法に比べ同一19例，増強(+1~+2) 4例と若干の増強傾向を認めたが，抗体種別の特徴は認めなかった。また，抗体価を測定した7例中5例でモノクロ法が高く，特に抗Jraでは2例ともに2~3管の増強を認めた(Table 2-B)。冷式抗体17例は両法とも陰性10例，いずれかの方法で陽性7例であり，陽性例のうち1例(抗M)はポリクロ法でのみ陽性であった(Table 1-C)。両法とも陽性6例の反応強度はモノクロ法がポリクロ法に比べ，同一5例，増強(+1) 1例とほとんど差を認めなかった。

2. 操作中放置時間の検討

赤血球洗浄後の放置および遠心後の放置で

はDAT, IATにおいてモノクロ法，ポリクロ法ともに全例15分間放置しても凝集の強さに

Table 2 被凝集価，抗体価の比較

A					
検体	疾患名	検査法	反応の強さ	被凝集価	スコア
1	AIHA	モノクロ法	2+	8倍	23
		ポリクロ法	1+	1倍	5
2	AIHA	モノクロ法	2+	4倍	18
		ポリクロ法	1+	1倍	5
3	AIHA	モノクロ法	4+	256倍	80
		ポリクロ法	3+	128倍	61
4	悪性リンパ腫	モノクロ法	3+	64倍	58
		ポリクロ法	3+	64倍	46

B					
検体	抗体	検査法	反応の強さ	抗体価	スコア
1	抗Jra	モノクロ法	3+	512倍	79
		ポリクロ法	2+	64倍	53
2	抗Jra	モノクロ法	2+	64倍	50
		ポリクロ法	2+	16倍	37
3	抗E	モノクロ法	1+	4倍	15
		ポリクロ法	1+	2倍	10
4	抗Fy ^b	モノクロ法	3+	64倍	49
		ポリクロ法	3+	32倍	38
5	抗Le ^a	モノクロ法	1+	2倍	10
		ポリクロ法	1+	1倍	5
6	抗Di ^a	モノクロ法	1+	4倍	15
		ポリクロ法	1+	4倍	15
7	抗Di ^a	モノクロ法	1+	1倍	5
		ポリクロ法	1+	1倍	5

A. DAT (被凝集価), B. IAT (抗体価)

DAT: direct anti globulin test (直接抗グロブリン試験),

IAT: indirect anti globulin test (間接抗グロブリン試験),

AIHA: autoimmune hemolytic anemia (自己免疫性溶血性貧血)

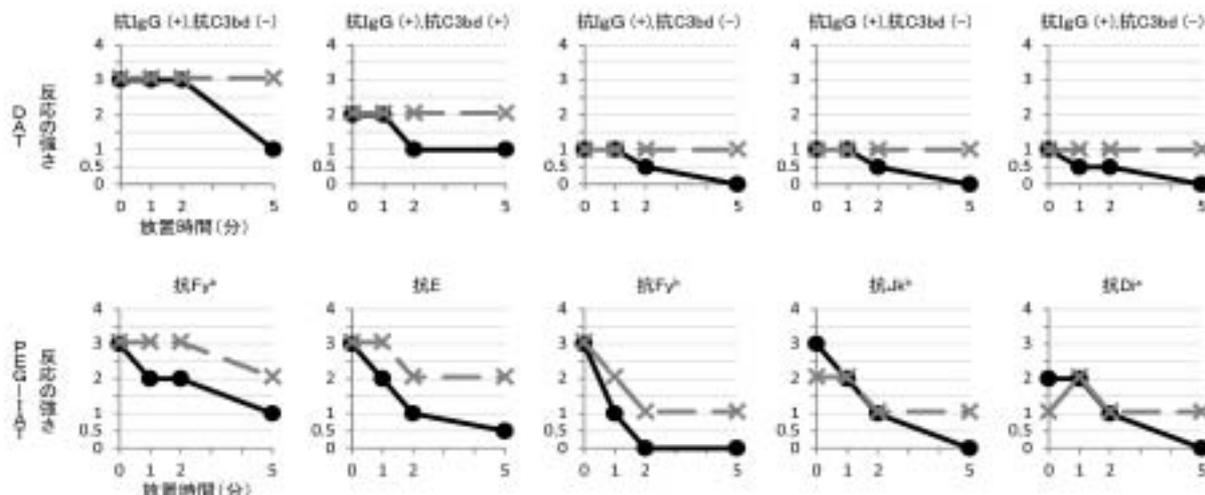


Figure1. 抗グロブリン試薬添加後遠心までの放置時間の影響

A. 赤血球3回洗浄後, B. 抗グロブリン試薬添加後, C. 遠心後

●:モノクロ法, ×:ポリクロ法

DAT: direct anti globulin test (直接抗グロブリン試験), PEG-IAT: polyethylene glycol- indirect anti globulin test

変化を認めなかった。抗グロブリン試薬添加後の放置では DAT においてポリクロ法は 5 例全例で変化を認めなかったが、モノクロ法では 1 例は 1 分後、3 例は 2 分後に減弱が認められ、5 分後には 3 例が陰性化した (Figure.1)。IAT においてポリクロ法では 5 例中 1 例は 1 分後、2 例は 2 分後に減弱が認められたものの、その後はほとんど進行せず、5 分後も全例検出可能であった。一方、モノクロ法では 4 例は 1 分後に減弱が認められ、5 分後には 3 例が陰性化した。

【考察】

抗グロブリン試薬は生体内における IgG の赤血球感作を検出する DAT、試験管内における IgG の赤血球感作を検出する IAT で用いられる。DAT、IAT は自己免疫性溶血性疾患、胎児・新生児溶血性疾患、溶血性輸血副作用の診断および防止のために重要な検査であり、その検出感度の向上が求められる。ポリクロ抗 IgG は IgG 型のポリクロ抗体であり、H 鎖 Fc 領域 (CH3) に加え、各種免疫グロブリンの L 鎖および他の部位にも反応する¹⁾のに対し、モノクロ抗 IgG は IgM 型のモノクロ抗体であり、IgG の CH3 に特異的に反応する。今回我々は、モノクロ抗 IgG の検出感度および操作中の放置による影響を従来のポリクロ抗 IgG と比較検討した。

DAT 陽性 15 例では 2 例がモノクロ法でのみ陽性であり、残り 13 例は半数近くがポリクロ法に比べ増強し、被凝集価は 4 例中低力価の 2 例で 2~3 管の増強を認めた。また、IAT では冷式抗体の検出感度は同等であったが、温式抗体 23 例は同一 19 例、ポリクロ法に比べ増強 4 例と増強傾向を認め、抗体価は抗 Jra2 例で 2~3 管増強した。モノクロ法で DAT および温式抗体の検出感度が増強した原因として、ポリクロ抗 IgG が IgG 型で抗原結合部位間の距離が最大 12~14nm、抗原結合部位が 2 か所であるのに対し、モノクロ抗 IgG は IgM 型であり、抗原結合部位間の距離が最大 30nm と幅広く、抗原結合部位は 10 か所と多いため達成される凝集力が高いことが挙げられる²⁾³⁾⁴⁾。この違いは DAT では弱陽性検体、IAT では赤血球上に対応する抗原数が少ない高力価低凝集力 high titer-low avidity (HTLA) 抗体、抗 Jra に、より反映されたと考えられた。

測定中の放置時間の検討では赤血球洗浄後、および遠心後の放置においては凝集の減弱を

認めなかった。しかし、抗グロブリン試薬添加後の放置ではモノクロ法は DAT では 2 分後、IAT では 1 分後、ほとんどの例で減弱を認め、5 分後には DAT、IAT とも過半数が陰性化した。一方、ポリクロ法は DAT では影響を受けず、IAT では 1 分後から 2 分後にかけて減弱したものの、5 分後も全例検出可能であった。赤血球洗浄後や抗グロブリン試薬添加後の放置により抗体が抗原から遊離し、偽陰性を呈するとされている⁵⁾。今回、抗グロブリン試薬添加後に放置することで、抗 IgG または赤血球結合 IgG がモノクロ法でより遊離していることが予想された。この原因としてモノクロ抗 IgG の性状が IgG に比べ親和性が低い IgM である⁶⁾ことや、試薬中の抗 IgG 以外の添加物等による影響が考えられた。以上のことから、モノクロ抗 IgG 添加後には速やかに遠心し、やむを得ず検査を中断する場合には、赤血球洗浄後または遠心後を選ぶ工夫が必要であると考えられた。

【まとめ】

試験管法において、モノクロ抗 IgG は DAT および IAT における温式抗体の検出感度を向上させる傾向を認めたことから、効果的かつ効率的な検査体制に貢献しうるものと考えられた。モノクロ抗 IgG 添加後は放置により凝集が減弱するため、速やかに遠心する必要がある。

【文献】

- 1) American Association of Blood Banks : 赤血球抗原抗体反応とそれらの検出, Technical Manual 13TH EDITION (日本語版) 271-283, 文祥堂, 東京, 2002
- 2) 清水勝 (監訳) : 感作と凝集と抗グロブリン試験, 絵でみる輸血 64-75, 医学書院, 東京, 1996
- 3) バイオラッド ラボラトリーズ株式会社 診断薬事業部 : 赤血球凝集反応の基礎知識 (5), Bio-Rad ID-News
- 4) 多田富雄 (監訳) : 抗原認識, 免疫学イラストレイテッド (原著第 2 版) 89-98, 南江堂, 東京, 1992
- 5) 佐々木正照, 渡邊直樹 : 抗グロブリン (クームス) 試験では, 血球の洗浄後やクームス血清添加後に, 長時間 (10 分以上) 放置してはならない, Medical Technology 2001 ; 29 : 1603-1604
- 6) 笹月健彦 (監訳) : B 細胞と液性免疫, 免疫 153-179, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 2009