

輸血テクニカルセミナー2014

実技テキスト

Ver1.1



主催：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

平成 26 年 3 月
平成 27 年 3 月 改正

平成 27 年 3 月 21・22 日

東邦大学医学部

実 技 編 — 指導のポイント —

輸血検査の標準化を図るため、凝集判定、血液型検査、不規則抗体検査の指導ポイントを明確にし、指導者が受講者の習得度合を確かめられるようにまとめてあります。

それぞれの施設や地域で行われる研修会の指導テキストとしてご活用ください。

- 実技を行う前に
- 凝集判定の目合わせにおける指導のポイント
- 血液型検査における指導のポイント
- 不規則抗体検査における指導のポイント
- 参考資料：試料作製例

【実技を行う前に】

◆ 器材の確認

- (1) 多本架遠心機・免疫血液学（血液型判定）用遠心機
検体分離、凝集判定および赤血球洗浄の遠心条件と操作法を確認
- (2) 恒温槽
水量を確認
37℃になっていることを確認
- (3) 自動血球洗浄遠心機
生理食塩液の量を確認
1回の分注量が適切か確認

◆ 試薬の確認

- (1) 生理食塩液、および必要な 抗体試薬、赤血球試薬、反応増強剤、抗ヒトグロブリン試薬、IgG感作赤血球を確認
- (2) それぞれの試薬について、外観および使用期限を確認
- (3) それぞれの試薬の滴下数、および使用法を確認

◆ その他の器具類の確認

- (1) 試験管 : $\Phi 12 \times 75 \text{mm}$
(または $\Phi 10 \times 75 \text{mm}$)、 ガラス製
- (2) 試験管立て : 上記の試験管が立てられるもの
- (3) スポイト : 約 $50 \mu\text{L}$ /滴、樹脂製
- (4) 洗浄ピン : 樹脂製のもの
- (5) 温度計 : 恒温槽の実温度を測定
- (6) タイマー

◆ サンプルの確認

- (1) 識別できるもの（名前、IDなど）を確認
- (2) 量、検体の状態（凝固の有無、血漿/血清の色調、溶血、ビリルビン、乳糜など）を確認

◆ その他

- (1) 記録のための判定記入用紙
- (2) 廃液、廃棄のためのバイオハザード用容器
- (3) ペーパータオル

《指導のポイント》

- ☞ 事前に機器類が正しく作動するかチェックする。
- ☞ 器材の基本的な操作を、確認する。
- ☞ 試薬および器具類が揃っているか確認する。
- ☞ サンプルが適切な状態かを確認する。

実技を行う前に

指導事項	具体的な項目	回答〔主な引用文献：輸血のための検査マニュアル(TM)、疑義解釈集(QA)〕
機器	事前に機器類が正しく作動するかチェックする	1) 判定用遠心機の管理(TM-p17、参照) (1) 回転数(可能な場合) (2) タイマー (3) 異常音、バランス 2) 自動血球洗浄遠心機 (1) ノズル、ボトル、ラインなどのメンテナンス (2) 生理食塩液の分注量や洗浄後の残量の点検 (3) 洗浄遠心機の設定条件の確認
	機材の基本的な操作を、確認する	3) 恒温槽 (1) サーモスタットの温度コントロールの動作状態 (2) 別の温度計による温度点検と記録
試薬・器具	検査に必要な試薬類・器具が適切に準備されているか？	1. 主な器具類(TM-p17、参照) 1) 試験管：Φ12×75mm (またはΦ10×75mm)、ガラス製 2) 試験管立て：上記の試験管が立てられるもの 3) スポイト：約 50 μL/滴、樹脂製 (採用前に 1 滴の量を確認する) 4) 洗浄ピン：樹脂製のもの 5) タイマー 2. 主な試薬(TM-p18、参照) 1) ABO 血液型(TM-p18、参照) (1) オモテ検査用試薬：抗 A 試薬、抗 B 試薬 (2) ウラ検査用試薬：3～5%の A ₁ 赤血球、B 赤血球、※O 型赤血球 2) RhD 血液型 (1) 抗 D 試薬 (2) Rh コントロール(抗 D 試薬の添付文書に従う) 3) 交差適合試験と不規則抗体検査 (1) 不規則抗体スクリーニング用赤血球 (D ^a 抗原陽性の赤血球含む) (2) 不規則抗体同定用パネル赤血球 (3) 反応増強剤 ① ポリエチレングリコール液(PEG)と② 低イオン強度溶液(LISS)のうち、少なくとも 1 種類 (4) 酵素溶液：不規則抗体同定用補助試薬として① ブロメリン液、② フィシン液、③ パパイン液のうち、少なくとも 1 種類 (5) 抗ヒトグロブリン試薬 ①多特異、②抗 IgG(PEG - IAT 法や直接抗グロブリン
	器具類の破損などはないか？	
	試薬および器具類が揃っているか確認する	
	試薬の使用量ならびに有効期限を確認したか？	

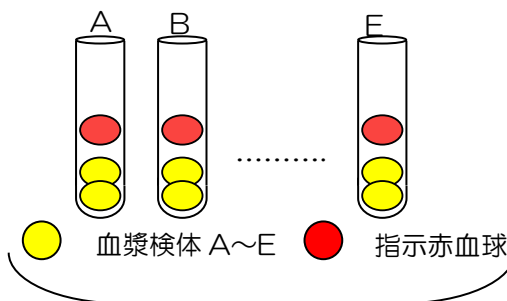
			<p>試験)</p> <p>(6) 3～5%IgG 感作赤血球</p> <p>(7) 0.85～0.9%生理食塩液(または局方生理食塩液)</p>
サンプル	サンプルが適切な状態かを確認する	サンプル量、検体の状態(血漿/血清の色調、フィブリンや不純物の有無など)を確認したか?	抗原抗体反応や凝集判定の妨げのなるようなものがあれば、あらかじめ排除して検査する。

【凝集判定の目合わせ】

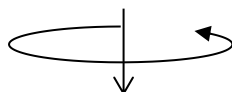
- ◆ 目的：施設内で凝集の強さや判定基準の統一を図ることは、とても重要である。術者間差を縮小させる方法として、典型的な反応強度を示すよう調製した試料を用いた「凝集判定の目合わせ」が効果的である。

◆ 操作手順：

- (1) 試験管を5本準備し、各試験管に A～Eまで試験管に書く。
- (2) 試験管番号に合わせて血漿検体をスポイトで2滴ずつ滴下する。
- (3) 血漿検体の分注もれを確認する。
- (4) 各試験管に指示赤血球(抗原陽性)を、1滴ずつ滴下する。



- (5) 入れ忘れを確認した後、よく混和し、室温で10分間放置する。
- (6) 試験管を、900～1,000G(血液型判定用遠心機の場合は、3,000～3,400rpm) 15秒遠心する。



凝集判定

- (7) 判定し、結果を記録する。

結果を確認し、各班で凝集判定の目合わせを行う。

凝集の強さにバラツキがある場合は、その原因について考察を行う。

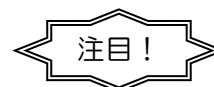
《指導のポイント》

- ☞ 試験管のマーキングや検体または試薬の分注もれの確認などテクニカルエラーを防止するための基本的な操作について考える。

- ☞ 判定時の注意点について考える。
 - ・遠心後の試験管の取り出し方
 - ・判定時、1度に持つ試験管の本数
 - ・判定時、凝集を確認する際の背景
 - ・セルボタンの向き など

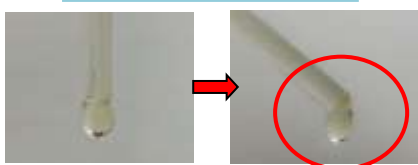
凝集反応の判定には血液型判定用遠心機を使用することが望ましい。

- ☞ 凝集の強さに差が出た際は、原因と対策について考える。
 - ・スポイトの操作法
 - ・試験管の振り方(傾け方) など

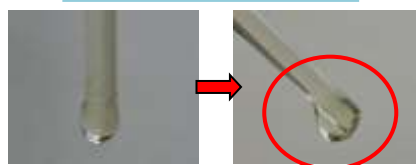


スポイトを用いて滴下する時、角度により滴下量が変わる。

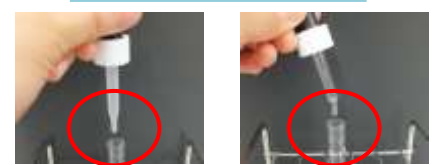
樹脂製



ガラス製











試薬ビン



先端の太さや材質により異なる。たとえば、スポイトを傾けると 壁面を伝って1滴の量が多くなるものもあれば(ガラス製)、逆に少なくなるものもある(樹脂製など)ので、事前に1滴の量を知っておくことが大事である。

先端に注意! スポイトの切り口が底面に対し水平になるように滴下する。

-凝集反応の分類-

反応強度	スコア	特徴と外観	背景の色調	
4+	12	1個の大きな凝集塊	透明	
3+	10	数個の大きな凝集塊	透明	
2+	8	中程度の凝集塊	透明	
1+	5	小さな凝集塊	赤く濁る	
w+	2	ごくわずかな微小凝集	赤く濁る	
0	0	凝集も溶血も見られない	赤く濁る	
m f		部分凝集	赤く濁る	
H(PH)		完全溶血(部分溶血)	赤く透明 (濁る)	

mf : mixed field agglutination H : hemolysis PH : partial hemolysis

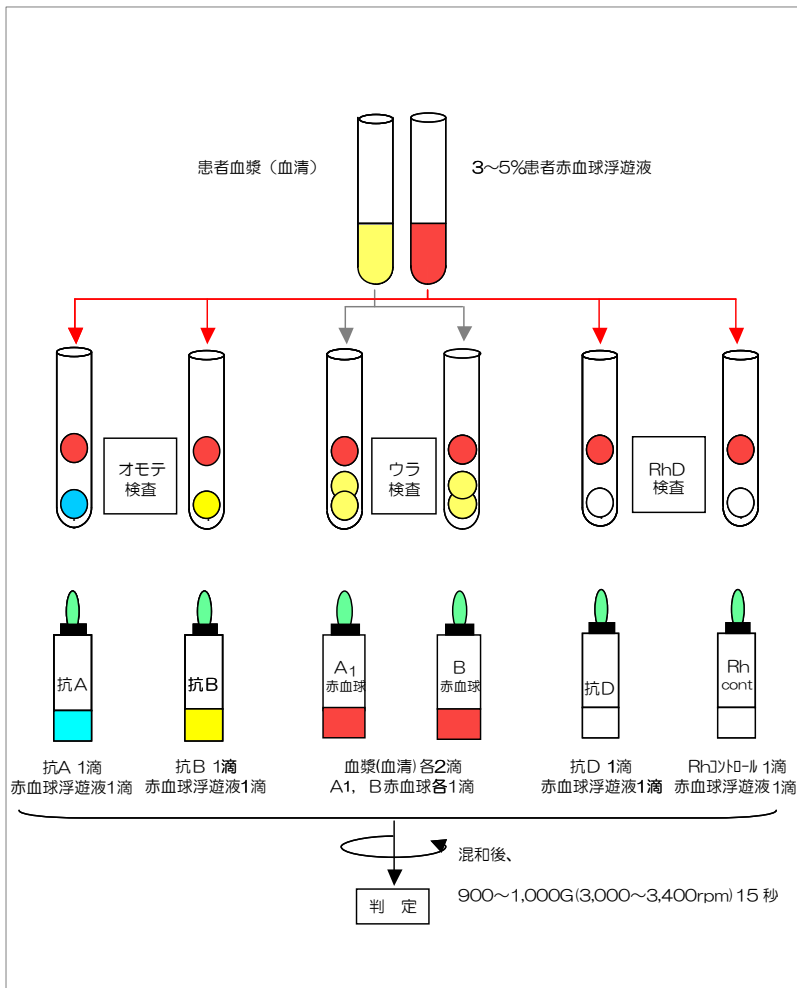
* 輸血のための検査マニュアル Ver.1.2 から引用

凝集判定の目合わせ		
指導事項	具体的な項目	回答〔主な引用文献：輸血のための検査マニュアル(TM)、疑義解釈集(QA)〕
分注	試験管のマーキングや検体または試薬の分注もれなど、テクニカルエラーの防止	<p>1) 検査用試験管の準備(TM-p1、参照)</p> <p>(1) 検査用試験管には患者名(または識別番号)や試薬名を明記する(例えば、スクリーニング赤血球やパネル赤血球の番号など)。</p> <p>(2) 分注ミスを防ぐため、検査用試験管は識別番号や試薬名などがよく見えるよう管口をきちんとそろえて試験管立てに準備する。</p>
	抗体試薬、患者血漿(血清)、患者赤血球、試薬赤血球の順に分注したか? 一定量を確実に分注したか?	<p>(2) 試薬と検体の分注操作手順と留意点(TM-p1、参照)</p> <p>(1) 分注忘れを目視確認できるよう、被検血清(血漿)や抗体試薬は赤血球試薬や赤血球浮遊液よりも先に添加する。しかし、血清(血漿)や解離液が溶血している場合は、血清(血漿)や解離液を分注する前に赤血球試薬や赤血球浮遊液を添加する。</p> <p>(2) 試薬や検体を分注する際は、スポイトの先端が試験管に触れないよう注意し、管底へ直接滴下する。</p>
	次のステップに移る前に、試験管に検体や試薬が分注されていることを確認しているか?	<p>(3) 試薬と検体の分注状態については、次のステップへ移る前に必ず目視確認する。</p>
判定	遠心機へ試験管をセット、および取り出す際の注意点	<p>検査用試験管の取り違い防止のため、日頃から遠心機へのセット開始位置や試験管立てへ戻す位置を決めておくことは重要である。</p>
	セルボタンを崩さないように静かに取り出ししているか?	<p>3. 凝集の見方(TM-p2、参照)</p> <p>遠心後、静かに試験管を取り出し、まず溶血の有無を観察する。</p>
	判定時、1度に持つ試験管の本数	<p>検査目的や力量に合わせて試験管を振ることが大切である。たとえば、オモチ検査では抗 A、抗 B 用の 2 本、ウラ検査では A1 赤血球と B 赤血球用の 2 本、RhD 検査では抗 D とコントロール用の 2 本、赤血球・抗体スクリーニングでは 4 本一緒、あるいは 2 本ずつ 2 回に分けて振るのが望ましい。</p>
	判定時、凝集を確認する際の背景	<p>3. 凝集の見方(TM-p2、参照)</p> <p>試験管は目の高さ以下で操作し、白色(光)を背景にして判定する。白色背景での観察は、微小凝集塊を見逃さないためにも重要である。赤血球沈渣を上にして、引き続き試験管を傾け、流れ出す際に認められる凝集塊の有無をよく観察する。</p>
凝集判定を行う時	<p>感染を防止するため、目の高さより低い位置で観察してい</p>	

	の、試験管の操作	るか？	
		基本、上向きで静かにセルボタンを試験管から剥がすようにゆっくり振っているか？	
重点項目	凝集の強さに差が出たときの、原因と対策	試験管の判定時の振り方は適切であったか？	
		反応時間、反応温度(室温)は適切であったか？	適宜、方法ごとに確認する。
		スポイトの傾け方による、1滴の量に違いはなかったか？	一般的に、樹脂製スポイトは傾斜して操作すると、垂直で操作したときよりも1滴の容量は減少するので注意する。これに反し、ガラス製は増加する(TM-p1、参照)。
		遠心機の設定は正しかったか？	900~1,000G(3,000~3,400rpm)15秒
		赤血球浮遊液の濃度は正しかったか(使用前に濃度を均一にしていたか)？	<p>赤血球浮遊液の濃度 3~5%、注 2: 赤血球浮遊液の濃度は、赤血球試薬の色調や自動血球計数装置のヘマトクリット値を参考にして調製するとよい。</p> <p>1) 赤血球試薬と赤血球浮遊液</p> <p>(1) 赤血球試薬や赤血球浮遊液は必ず使用時にスポイトでよく混和し、濃度を均一にしてから用いる。</p> <p>(2) 赤血球試薬の濃度を一定に保つため、分注後にスポイト内に残った試薬はすべて元の浮遊液へ戻す(TM-p1、参照)。</p>

【ABO 血液型と RhD 血液型検査】

《指導のポイント》



☞ 検体および試験管の並べ方、マーキングの仕方について、考える。

☞ 赤血球浮遊液を作製する前に、基本操作や手順について考える。

☞ 複数の検体を処理する場合、検体や試薬の分注手順について考える。

☞ 検体・試薬の入れる順番について、色の薄いものから入れる理由を考える。

☞ ABO および RhD 検査における判定上の注意点、確認すべき点について考える。

☞ ABO および RhD 検査の判定結果に対し、どのような場合に再試験や追加試験が必要か考える。

ABO・RhD 血液型

指導事項		具体的な項目	回答〔主な引用文献:輸血のための検査マニュアル(TM)、疑義解釈集(QA)〕
赤血球浮遊液	3～5%赤血球浮遊液作製の基本操作や手順について	1 回洗浄を行い、赤血球浮遊液を作製しているか？	患者血漿中の夾雑物質の影響を回避するため、原則として必要
		再検査を実施する際には、赤血球浮遊液から作り直しているか？	分注ミスや再現性を確認する為に赤血球浮遊液から作り直す
分注	検体および試験管の並べ方、マーキングの仕方について	患者名(または識別番号)、検査項目、試薬名などを試験管に明記しているか？	1) 検査用試験管の準備(TM-p1、参照) (1) 検査用試験管には患者名(または識別番号)や試薬名を明記する(例えば、スクリーニング赤血球やパネル赤血球の番号など)。 (2) 分注ミスを避けるため、検査用試験管は識別番号や試薬名などがよく見えるよう管口をきちんとそろえて試験管立てに準備する。
		試験管はワークシートの記入欄に準じて並べているか？	
重点項目	複数の検体を処理する場合、検体や試薬の分注手順について	検体の取り間違いを防止する方策を取っているか？	3) 試薬と検体の分注操作手順と留意点(TM-p1、参照) (1) 分注忘れを目視確認できるよう、被検血清(血漿)や抗体試薬は赤血球試薬や赤血球浮遊液よりも先に添加する。しかし、血清(血漿)や解離液が溶血している場合は、血清(血漿)や解離液を分注する前に赤血球試薬や赤血球浮遊液を添加する。 (2) 試薬や検体を分注する際は、スポイトの先端が試験管に触れないよう注意し、管底へ直接滴下する。 (3) 試薬と検体の分注状態については、次のステップへ移る前に必ず目視確認する。 (4) インキュベーション(抗原抗体反応)は、試験管をよく振って試薬と検体を十分に混和してから行う。
	検体・試薬の入れる順番について、色の薄いものから入れる理由について	試薬の入れ忘れ、コンタミネーションを防止する目的を理解しているか？	
再検基準	ABO および RhD 検査における判定上の注意点、確認すべき点について	オモテ検査でどのような反応が再検査または問い合わせの対象となるか？	部分凝集やオモテ・ウラ不一致なし: 3+以下 部分凝集またはオモテ・ウラ不一致あり: 反応強度にかかわらず
		ウラ検査でどのような反応が再検査対象となるか？	正しい検査が実施されていることを前提にあえて目安(再検基準ではない)を設けるとすれば、過去の経験的なものからおおよそ1+程度を推奨する。ただし、最終的に再検・精査を行うかどうかの判断は下記の要因などを総合的に考慮する必要があり、この目安はオモテ・ウラ検査結果が一致している場合であり、その結果が不一致の場合は再検・精査が必要である(QA-p5、Q2.1.9 参照)。 IV. 異常反応に対する考え方(TM-p13、参照)
		RhD 検査の再検査の基準は？	判定手技が正しく行われたことを前提として、直後判定が w+や1+の弱反応の場合、間接抗グロブリン試験を実施し、結果が強陽性になった場合は D 陽性と判定する。輸血用血液製剤の選択は、「輸血療法の実施に関する指針」にもあるように、直後判定が陽性が陰性かで決まる。前述のような結果が得られた場合は

		通常 D 陽性血を準備するが、患者が妊娠可能な女性や女兒の場合は D 陰性血を選択しても間違いではない。また、後々確認が必要になる場合を想定し、抗 D 試薬との反応が弱かったという結果を記録しておくことも必要である(QA-p6、Q2.1.11 および Q2.1.12 参照)。
	Rh コントロール試薬を併用しているか？	連鎖形成や寒冷凝集素等の影響を考慮し、原則として必要
	D 陰性確認試験を実施しているか？	D(-)との鑑別するため、原則として必要

《記入例》

通常の判定

オモテ検査			ウラ検査			ABO 総合判定
抗 A 試薬	抗 B 試薬	判定	A ₁ 赤血球	B 赤血球	判定	
O	4+	B 型	4+	O	B 型	B 型

部分凝集を認めた場合

オモテ検査			ウラ検査			ABO 総合判定
抗 A 試薬	抗 B 試薬	判定	A ₁ 赤血球	B 赤血球	判定	
O	m f	判定保留	4+	O	B 型	判定保留

グレードは、参考程度にとどめる。

オモテ・ウラ不一致の場合

オモテ検査			ウラ検査			ABO 総合判定
抗 A 試薬	抗 B 試薬	判定	A ₁ 赤血球	B 赤血球	判定	
4+	4+	AB 型	4+	3+	O 型	判定保留

【不規則抗体スクリーニング】

《指導のポイント》

① 生理食塩液法

患者血漿（血清）
+
スクリーニング赤血球

900~1,000G(3,000~3,400rpm)
15 秒遠心

直後判定

☞ スクリーニング赤血球の意義を考える。

☞ 複数検体を処理する場合、基本操作や検査手順について考える。

☞ 生理食塩液法の意義について考える。

注目！

スクリーニング赤血球の抗原接合性に着目！
Rh, Duffy, Kidd など、臨床的に意義のある抗体を検出するためには、ホモ接合体の赤血球を含むことが望ましい。また、アジア系人種に特有の Diego 血液型抗原、特に Di^a に対する同種抗体を検出するためには、 $Di(a+)$ 赤血球を別に購入する必要がある。

② PEG を用いた間接抗グロブリン法
生理食塩液法の試験管に PEG 試薬を添加

37°C/10~15 分間加温
生理食塩液で 3~4 回洗浄
抗ヒトグロブリン試薬 2 滴添加

900~1,000G(3,000~3,400rpm)
15 秒 遠心

判定

☞ 反応増強剤の意義を考える。

☞ 3 回洗浄を行う意義と注意点について考える。

☞ 抗ヒトグロブリン試薬の原理について、正しく理解しているか？ また、抗ヒトグロブリン試薬を使用する意義と使用時の注意点について考える。

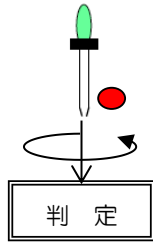
注目！

洗浄回数は、3 回で大丈夫？

血清(血漿)のタンパク濃度や使用する反応増強剤によって、洗浄回数を増やす必要がある場合がある。その理由と確認方法を理解しておこう。

③ IgG 感作赤血球 添加

900~1,000G(3,000~3,400rpm)
15秒 遠心

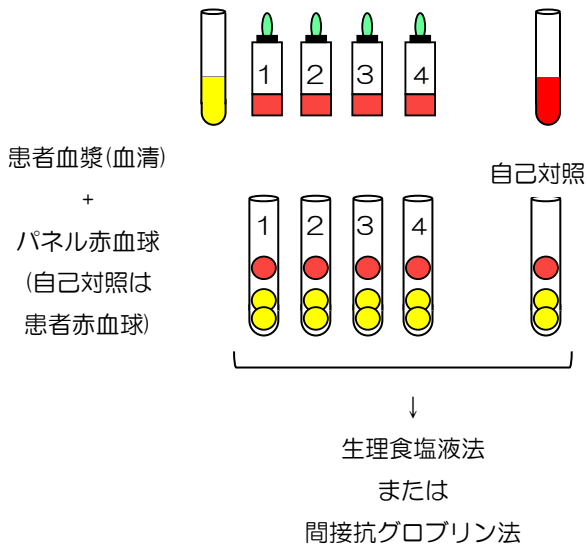


☞ IgG 感作赤血球の原理について、正しく理解しているか？また、陰性となった場合の原因と対処法について考える。

☞ IgG 感作赤血球を用いても確認できないヒューマンエラーについて考える。

【不規則抗体同定検査】

不規則抗体スクリーニング検査で陽性を呈した方法で実施



《指導のポイント》

☞ 自己対照の意義を考える。

☞ 可能性の高い抗体と否定できない抗体について考える。

☞ 消去法を行う意義と正しい消去の仕方について考える。

注目！

消去法を行う時の、D^aとKの考え方
どちらも、相対する因子が高頻度抗原であること、量的効果をあまり示さない、という観点から、どう対処するか考える。

不規則抗体スクリーニング		
指導事項	具体的な項目	回答〔主な引用文献：輸血のための検査マニュアル(TM)、疑義解釈集(QA)〕
意義	スクリーニング赤血球の意義について	量的効果を示す不規則抗体を的確に検出するため、考慮すべき点は何か？ Rh、Kidd、Duffy、MNSの血液型抗原については、ホモ接合体の赤血球が少なくとも1つ含まれる試薬を選択する。
	スクリーニング検査に、Di ^a 血球も加えているか？	抗 Di ^a は溶血性輸血副作用や新生児溶血性疾患の原因となることがあるので、Di(a+)赤血球をスクリーニング赤血球に含める必要がある。
重点項目	複数検体を処理する場合、基本操作や検査手順について	検体の取間違いを防止する方策を取っているか？ ABO/RhD 検査の項に準ずる。
方法・原理の理解度	生理食塩液法の意義について	検出される抗体の臨床的意義や抗体スクリーニングで生理食塩液法を行う意義について理解しているか？ 一部の低温反応性抗体は反応増強剤使用による間接抗グロブリン試験で偽陽性を呈することがあり、生理食塩液法(迅速法)で予めその有無を確認しておくことは、引き続き実施する間接抗グロブリン試験の結果解釈に有用(QA-p9、Q2..3.5 参照)。
	反応増強剤の意義を理解しているか？	種類、特性や方法を理解しているか？ IgG 抗体を検出するための試薬であることを理解しているか？ 臨床的意義のある 37°C 反応性の同種抗体(IgG)を検出するため、不規則抗体スクリーニングでは必ず間接抗グロブリン試験(indirect antiglobulin test、IAT)を実施する(TM-p10、参照)。 1) 感度は PEG-IAT>LISS-IAT>ALB-IAT((QA-p8-9、Q.2.3.2 および Q.2.3.7 参照)。 2) PEG を添加すると強く白濁し、遠心洗浄中に γ グロブリンが沈殿しやすくなる((QA-p8-9、Q.2.3.3 参照)。そのため、間接抗グロブリン試験の洗浄回数を通常の 3 回から 4 回にする必要がある。
	3 回洗浄を行う意義と注意点について	IAT(試験管法)で行う洗浄操作の意味を理解しているか？ 反応増強剤の特性を理解し、洗浄回数を設定しているか？ 赤血球抗体以外の IgG 蛋白による影響を洗浄操作によって排除するため。
	IgG 感作赤血球の意義と反応が陰性の場合の対策	IgG 感作赤血球を使用しているか？ IgG 感作赤血球の使用目的を理解しているか？ 抗ヒトグロブリン試薬は確実に滴下したか？ 洗浄に使用した生理食塩液の量は十分であったか？ 間接抗グロブリン試験の精度管理上、必要不可欠な試薬である。 1) 洗浄操作や洗浄回数、2) 抗グロブリン試薬の添加量が正しかったかを確認するための試薬があるが、それらに問題がなければ、別の反応増強剤を用いて間接抗グロブリン試験を再検査する。

抗体同定

指導事項		具体的な項目	回答〔主な引用文献：輸血のための検査マニュアル(TM)、疑義解釈集(QA)〕
自己 と同 種の 鑑別 点	自己対照の 意義について	同種抗体と自己抗体の鑑別の 一助となることを理解している か？	抗体スクリーニング(+)または交差適合試験の主試験(+)の時、自己 対照(-)なら同種抗体、自己対照(+)なら自己抗体である可能性が高 い。ただし、通常3カ月以内に同種免疫感作(輸血歴、妊娠歴、移植 歴)がないことが必要条件。
消去 法の 理解 度	可能性の高 い抗体と否定 できない抗体 について考え る	可能性の高い抗体を理解してい るか？	‘可能性の高い抗体’は、パネル赤血球との反応態度、すなわち反 応パターン、反応の強さや反応温度などから推定する。特に反応パ ターンは抗体の特異性を表すため、抗体同定においては最も重要な 情報である。そのため、まずパネル検査で得られた反応パターンと 一致する抗原表の血液型(抗原)を探し、反応パターンと一致した抗 原に対する抗体はすべて‘可能性の高い抗体’となる。 もし、反応パターンと一致する特異性が容易に見つからなかった場 合は、‘可能性の高い抗体’の推定を保留して、「消去法」を用い‘否 定できない抗体’を推定する。その際、消去法で除外できない抗体特 異性が複数残った場合は、抗体が複数存在する可能性があります。 その場合は、反応条件の変更、反応性の単純化や酵素または化学 処理赤血球との反応性の確認、さらには除外できていない抗体に対 する抗原を1つのみ持つパネル赤血球で精査し、除外できない抗体 特異性を絞り込み、最終的に‘可能性の高い抗体’として抗体同定 する。
		否定できない抗体を理解してい るか？	
	消去法を行う 意義と正しい 消去の仕方 について	量的効果を理解してるか？	量的効果が認められている血液型抗原において、ホモ接合体の赤 血球はヘテロ接合体よりも抗原決定基数が約2倍と多くなっている。 そのため、結合できる抗体数もホモ接合体の方が多くなり、結果とし て凝集反応もホモ接合体の赤血球の方が強く起こる。
	消去法を行う 時の Di(a+) および K に対 する抗体の 考え方	Di(a+b+)赤血球や K+k+赤血球 の反応が陰性の場合、暫定 的に抗 Di ^a や抗 K を消去する考 え方を理解しているか？	Kell と Diego の量的効果は Rh、Kidd、Duffy、MNS ほど明瞭ではな い。また、Diego(a+b-)赤血球が稀なことから、抗 Di ^a は常に「否定でき ない抗体」として考慮しなければならなくなる。そこで、推奨消去法で は例外的に Kell や Diego の抗原がヘテロ接合体である赤血球につ いては、たとえ反応が陰性であっても暫定的に消去できるルールとし た(QA-p12、Q2.3.20 および p13、Q2.3.21 参照)。
消去法以外 に、抗体同定 をサポートす る方法として	抗原の特性を理解しているか？	<ol style="list-style-type: none"> 1) Duffy や MNS 血液型抗原は酵素感受性を有しているので、酵素 法を生理食塩液法や間接抗グロブリン試験と併用することによっ て、反応性の消失からこれらに対する抗体を推定できる。 2) Rh 血液型抗原に対する抗体は酵素法で反応性が増強されるこ とがある。 3) 弱い 37°C 反応性の抗体の検出・同定には、酵素処理赤血球を 用いた間接抗グロブリン試験が有用となる場合がある(ex.抗 Kidd や抗 Rh 等)。 	

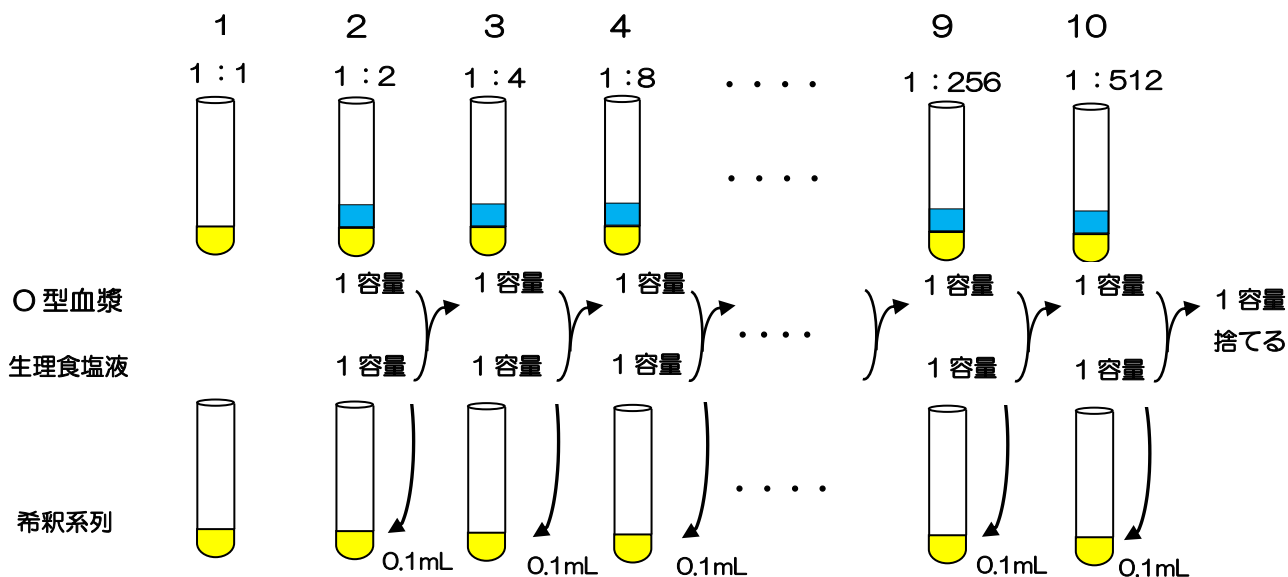
参考資料：試料作製例

【凝集反応の目合わせ検体の濃度調製例】

○型血漿を用いた目合わせ検体の調製（生理食塩液法）

準備する物：○型の血漿、生理食塩液、A型赤血球またはB型赤血球

- ① ○型血漿を準備する。
あらかじめ血漿はフィルターを通すか、遠心して浮遊物を除去しておく。
- ② ○型血漿は、下記のとおり希釈系列を作製する。



- ③ 各試験管に 3~5%の A 型 (B 型) 赤血球を 50 μ L 加え、10 分間室温放置後 900~1,000G (3,000~3,400rpm) 15 秒遠心し判定を行う。

例)

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
希釈倍率	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512
凝集の強さ	4+	4+	3+	2+	2+	1+	W+	0	0	0
	← 4+ →	3+	← 2+ →	1+						

- ④ 凝集判定の結果から ○型血漿を希釈して、各凝集の強さになるよう調製を行う。
上記の場合、○型血漿を4倍希釈すれば 3+の凝集、10 倍希釈すれば 2+の凝集、30 倍希釈すれば 1+の凝集が得られる。
 - ⑤ 調製後は、濃度が均一になるよう十分に攪拌後、再度遠心し、凝集の強さを確認する。
注) 調製後に長期間使用しない場合は、調製検体を分注し凍結保管する。
- 作製ポイント) ・各強さの凝集検体は、凝集が弱くなることを考慮し若干強めに調製する。
・作製した凝集検体は濃度が均一になるよう十分攪拌する。
・凍結保存する場合は、希釈液に 6%アルブミン溶液を使用し-20℃以下で保存する。

上記は生理食塩液法での目合わせ検体の作製法であるが、○型血漿の代わりに抗Dヒト由来のポリクローナル試薬とRhD陽性赤血球を用いることで、間接抗グロブリン法での目合わせ検体を作製することも可能である。







【血液型検査検体作製例】

《部分凝集検体の作製方法》

- ① 2種類の赤血球（例 A型とO型）を準備し、生理食塩液で3回洗浄する。
- ② 赤血球は、15%～20%の割合で混合する。

例） A型の患者にO型の赤血球製剤を輸血した検体を作製する場合、
 A型赤血球：O型赤血球＝4：1の割合で混合する。
 緊急輸血でO型赤血球を輸血される症例が多くなっている。
 初心者に指導する場合、このように実例に沿った検体を用いるとよい。

- ③ よく混和し、一部を確認試験に用いる。
 A型赤血球とO型赤血球の混合比の違いにより、下記のような背景が得られる。検出可能と思われる濃度を選択する。

A型:O型比	100:0	80:20	60:40	40:60	20:80	0:100
反応像						

- ④ アルセバー液などの赤血球保存液を赤血球沈渣と等量加え50%の赤血球浮遊液にする。
 注） ・検体調製後はできるだけ早く使用する。
 ・検体に溶血が見られた場合は、赤血球を1度洗浄して使用する。
 （溶血がひどい場合は、検体を再度作製する必要がある。）

《ウラ検査で全ての赤血球と凝集する検体の作製方法》

- ① 血漿を準備する（血液型は何型でもよい）。
- ② 抗D試薬の抗体価を測定する。
- ③ 抗D試薬が1+となるように、準備した（またはAB型の）血漿で希釈する。
 注） 市販されているウラ検査用の赤血球試薬は、RhD陰性のプール赤血球であるため、抗D試薬を用いても凝集は起こらない。その場合は、ウラ検査用赤血球浮遊液を自家調製するか、抗体試薬を抗D以外にする（例 抗e血清など）。
- ④ よく攪拌した後、一部を確認検査に用いる。
 注） ・調製後はできるだけ早く使用する。使用できない場合は凍結保存しておく。
 ・模擬検体であるためその後の確認検査ができない。初心者指導に使用する際には注意が必要である。

作製ポイント） ・材料でFFPを使用する際には、溶解後フィルターを通して浮遊物を除去するか、遠心して浮遊物を除去する。
 ・抗M血清など低温反応性抗体でも作製可能である。

【模擬試料を作製するための手順】

不規則抗体検査陽性検体は、血漿に種々の抗血清を混ぜれば簡便に作製できる。しかし、種々の抗血清は価格が高く大量に購入することは事実上不可能である。

陽性赤血球と陰性赤血球を任意に組み合わせてパネル赤血球を作製することで、比較的入手しやすいRh抗血清を用いて模擬的に種々の特異性を示す抗体として作製することができる。

《抗D試薬を用いた作製法》

血漿および模擬パネル赤血球の準備

① 血漿の作製：

- 1) 間接抗グロブリン法により抗D試薬の抗体価を測定する。
- 2) 抗D試薬が1+~2+になるように、準備した血漿で希釈する。

② 模擬パネル赤血球の作製

- 1) O型RhD陽性赤血球とO型RhD陰性赤血球を3回洗浄する。
- 2) 3回洗浄したO型RhD陽性赤血球とO型RhD陰性赤血球を3~5%の浮遊液にする。
- 3) 調製した赤血球浮遊液を用いてパネル赤血球を作製する。

模擬パネル赤血球の作製例 (例 抗Fy^aを想定した場合)

- 1) 下記、抗原組成表の場合、RhD陰性およびRhD陽性の赤血球を2本ずつ作製する。
- 2) 抗原組成表のFy^a抗原の有無に合わせて、No.1のFy(a-)のパネル赤血球にはRhD陰性の赤血球、No.2のFy(a+)のパネル赤血球にはRhD陽性の赤血球、というように、Fy^aの抗原と使用するRhD陽性赤血球が合致するように並べる。
抗原組成表に記載されている抗原(表現型)は架空のものであり、実際とは異なる。
- 3) 抗D保有血漿を試料として、抗体同定を行う。

例)

No.	使用する赤血球	D	C	c	E	e	……	Fy ^a	Fy ^b	PEG-IAT
1	RhD-	+	+	+	+	+	……	0	+	0
2	RhD+	0	0	+	0	+	……	+	0	2+
3	RhD+	0	0	+	0	+	……	+	0	2+
4	RhD-	+	+	0	0	+	……	0	+	0

上記、抗D保有血漿と模擬パネル赤血球を用いて不規則抗体検査を行うことにより、抗Fy^aが可能性の高い抗体として検出される。

このように、抗Dを使用した場合はRhD陽性赤血球とRhD陰性赤血球を組み合わせることで種々の不規則抗体模擬試料を作製することが可能となる。

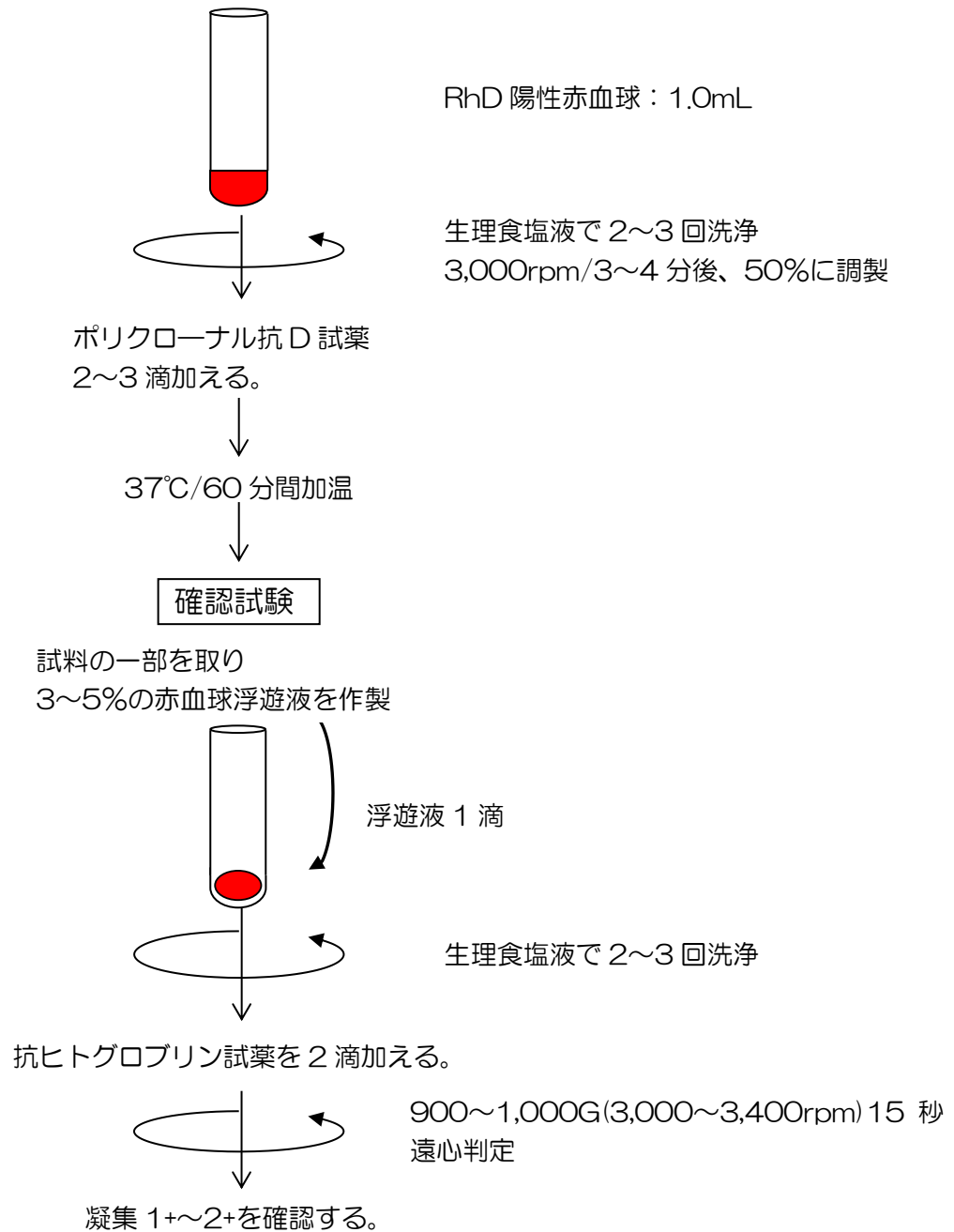
また、抗原組成表の(+)と(-)を置き換えることにより、否定できない抗体も自由に作製することができる。

※ 注意点

1. 抗体の特異性を生かした反応(反応温度や、酵素法で増強、失活など)を見ることはできない。
2. 量的効果は識別できない。

作製ポイント)・抗原陽性・陰性が作製する上で重要になる。作製する際は、間違えて分注しないように分別し計画的に作業する。

【IgG 感作赤血球（直接抗グロブリン試験陽性赤血球）の作製法】



- 作製ポイント)
- 反応させる時間を調整することで、目的とする凝集の強さを作製できる。
 - 反応途中に試料を採取し、凝集の強さを確認する。
 - 感作に使用する抗血清はポリクローナルを用いる。
 - 作製後すぐに使用できない場合は、赤血球保存液に浮遊させる。
(溶血や赤血球の劣化が考慮されるため長期保存はおこなわない。)
 - 感作処理後、赤血球沈渣を良く洗浄する。
(抗血清が残っていると感作が進んでしまい凝集が強くなる。)

輸血テクニカルセミナー2014 実行委員

輸血テクニカルセミナー2014 実行委員長 奥田 誠

日本輸血・細胞治療学会
輸血検査技術講習委員会

委員長	奥田 誠	東邦大学医療センター大森病院 輸血部
委員	星 順隆	日本輸血・細胞治療学会 理事
委員	高梨 美乃子	日本赤十字社血液事業本部
委員	田崎 哲典	東京慈恵会医科大学病院 輸血部
委員	安田 広康	福島県立総合衛生学院
委員	東谷 孝徳	佐賀大学医学部附属病院 検査部
委員	小林 信昌	東海大学医学部附属病院 臨床検査技術科輸血室
委員	高橋 智哉	市立札幌病院 検査部
委員	石丸 健	日本赤十字社血液事業本部 検査管理課
委員	丸山 美津子	三重大学医学部附属病院 輸血部
委員	森山 昌彦	都立駒込病院 輸血細胞治療科
委員	道野 淳子	富山大学附属病院 輸血・細胞治療部
委員	深田 恵利奈	済生会中津病院 検査技術部 輸血検査室
委員	藤井 明美	県立広島病院 臨床研究検査科
委員	伊藤 正一	東北ブロック血液センター 品質部検査一課
委員	柿沼 幸利	バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社 診断薬事業部 IHビジネスユニット
委員	古杉 光明	オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社 テクニカルサービスセンター
委員	宮成 勇二	株式会社 イムコア マーケティング部

日本臨床衛生検査技師会 支部輸血部門担当者

北日本支部	委員	高橋 一哲	新潟県立新発田病院 臨床検査科
関東甲信支部	委員	山川 朋世	獨協医科大学病院 輸血部
首都圏支部	委員	鈴木 克	山手メディカルセンター 検査部
中部圏支部	委員	岩崎 浩	市立栢波病院 検査技術部
近畿支部	委員	吉田 正明	滋賀病院 統括診療部
中四国支部	委員	土居 靖和	愛媛大学医学部附属病院 輸血部
九州支部	委員	坂元 あい子	宮崎大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部

共同事業協議会

委員	奥田 誠	東邦大学医療センター大森病院 輸血部
委員	松本 祐之	名古屋大学医学部附属病院 臨床検査部
委員	岡田 茂治	埼玉県がんセンター
委員	星 順隆	日本輸血・細胞治療学会 理事

当日実務委員

委員	栗林 智子	東邦大学医療センター大森病院 輸血部
委員	日高 陽子	東邦大学医療センター大森病院 輸血部
委員	本田 昌樹	青森市民病院 臨床検査部
委員	森 威典	武蔵野赤十字病院 輸血部
委員	井出 大輔	近畿大学医学部附属病院 輸血細胞治療センター

本テキストは無断転写を禁じます。

2015年3月21日、22日