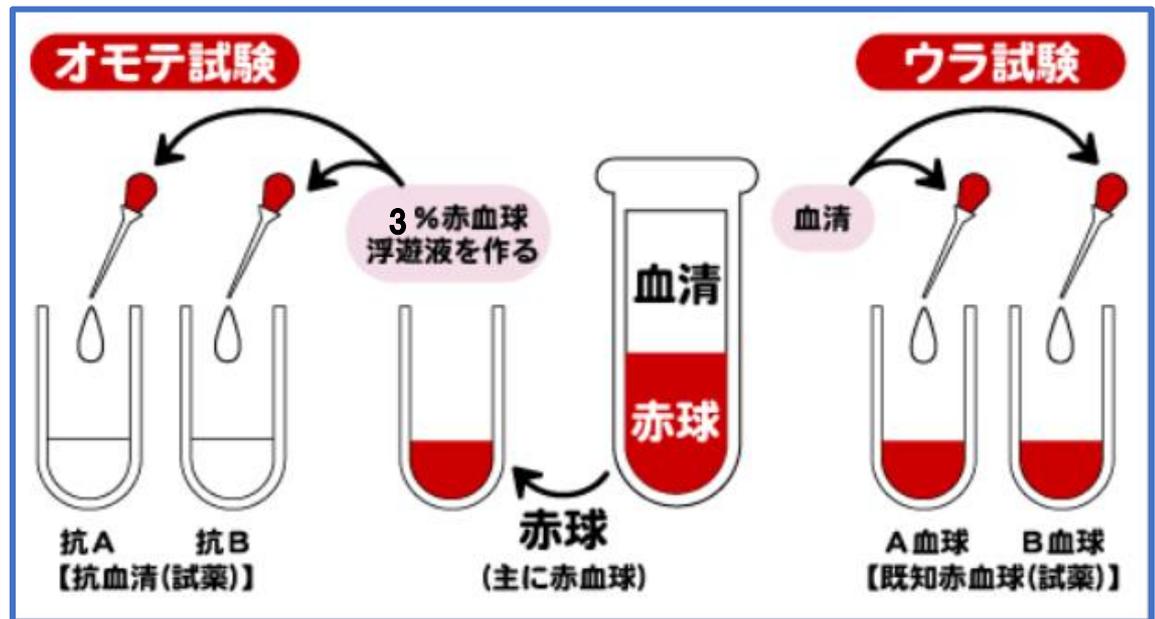


輸血検査の基礎と手技

国立がん研究センター東病院
阿出川裕子

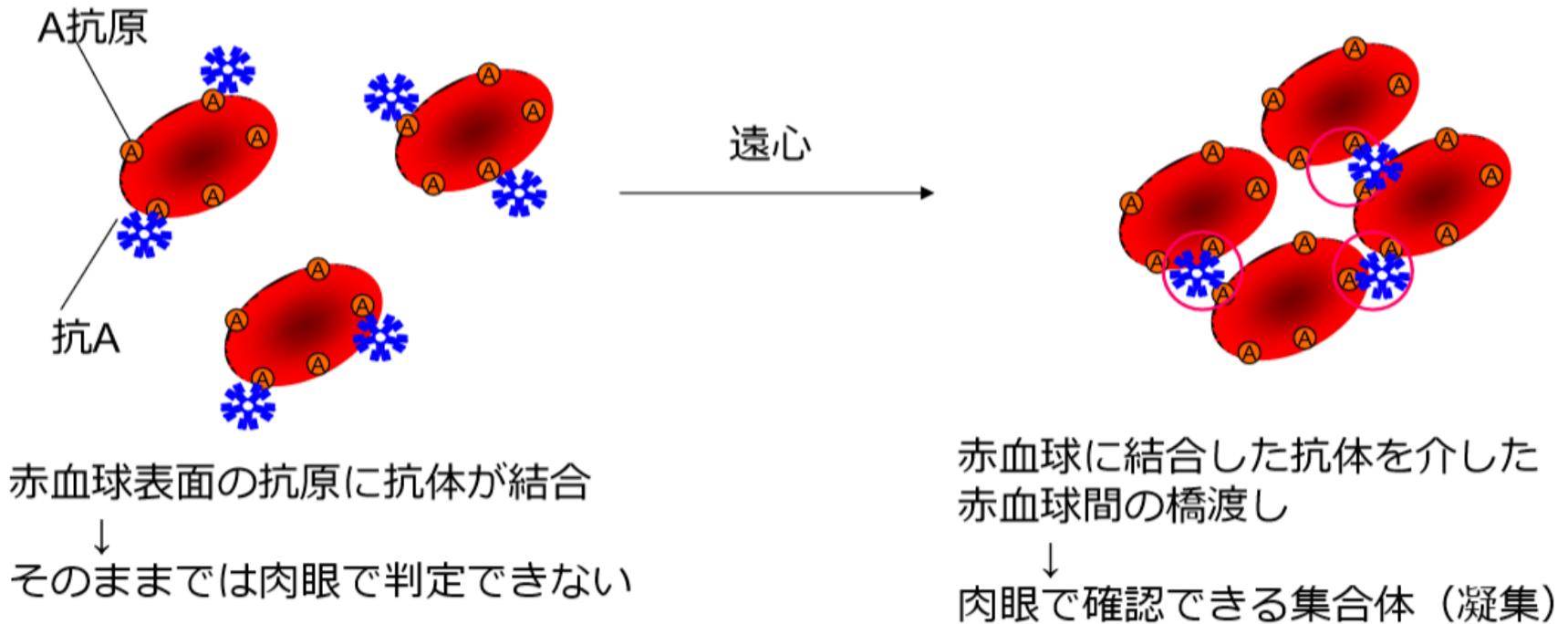
本日のお話

1. ABO・RhD血液型検査
2. 交差適合試験
3. まとめ

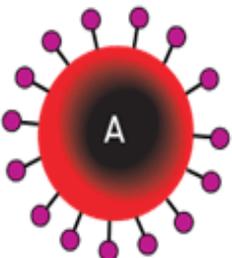
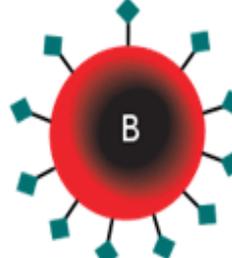
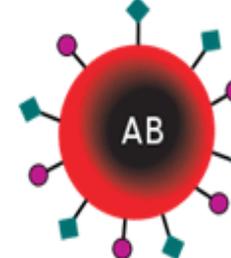
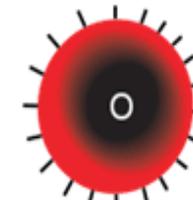
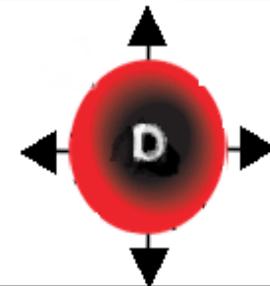


抗原抗体反応の検出

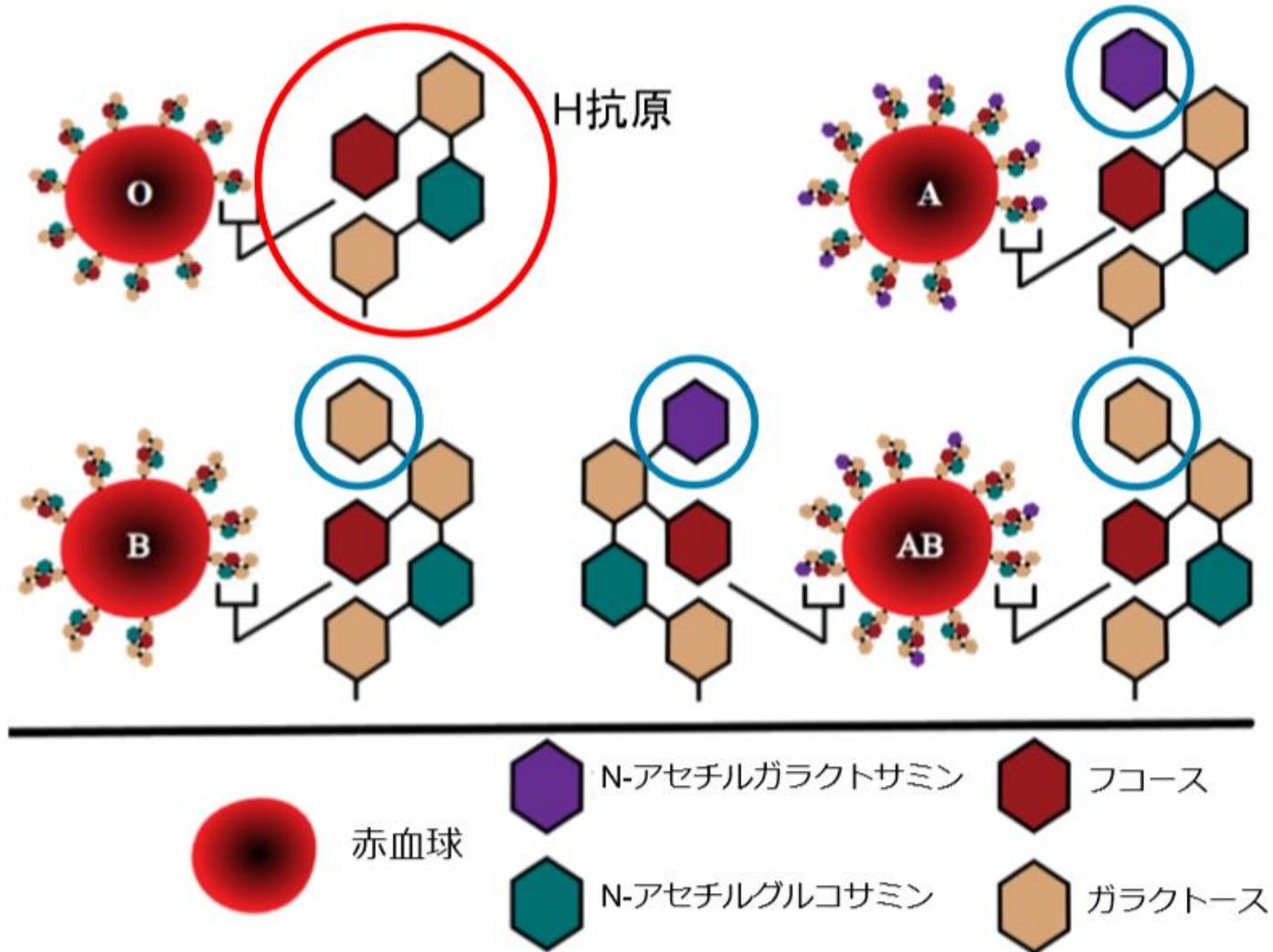
輸血検査では一般的に抗原抗体反応の有無を赤血球凝集の有無で判断する



ABO・RhD血液型

	A型	B型	AB型	O型	RhD陽性
赤血球型					
抗原	 A 抗原	 B 抗原	 A・B 抗原	なし	 D 抗原
抗体	 B 抗体	 A 抗体	なし	 A・B 抗体	なし

ABO抗原



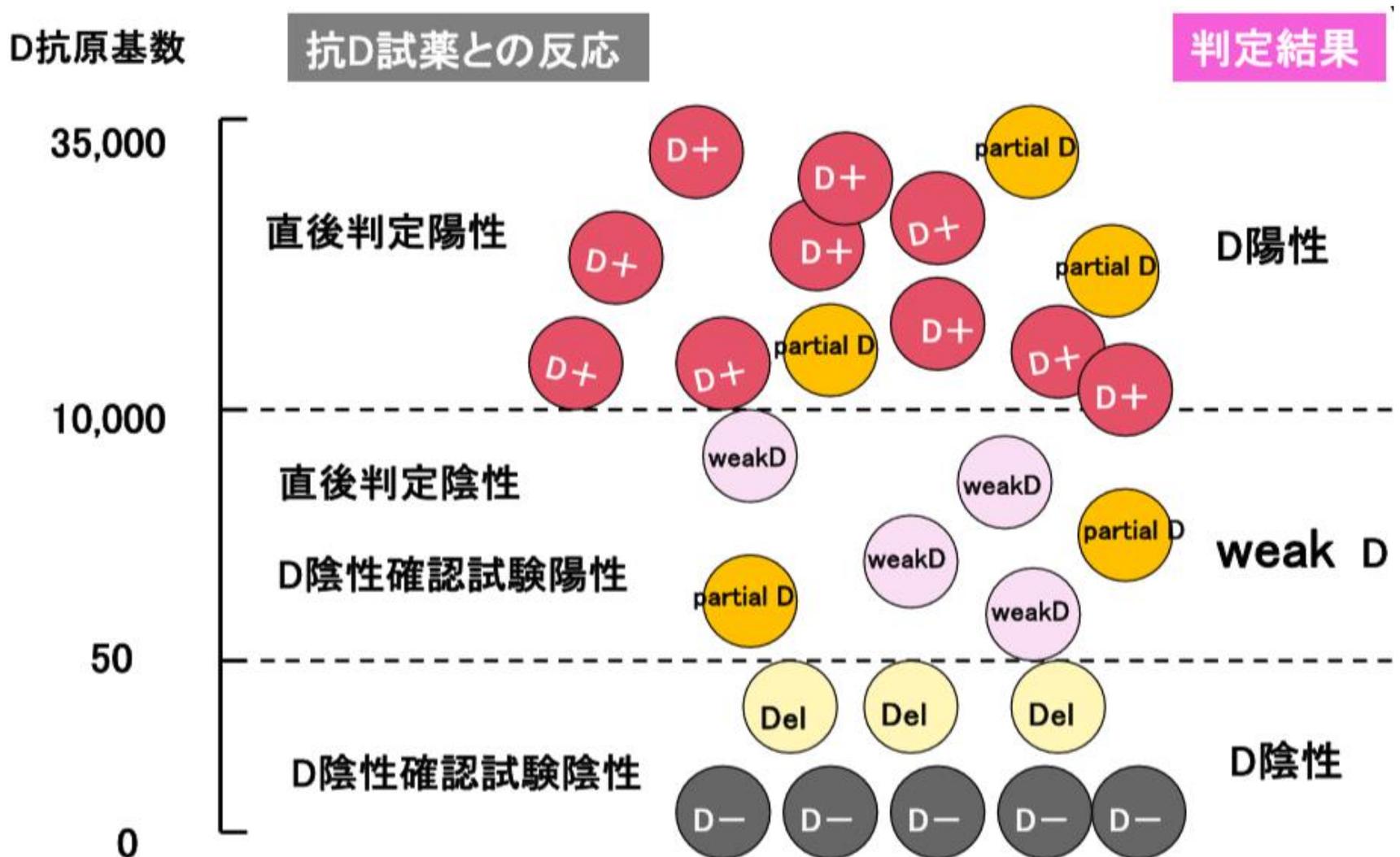
ABH抗体の発現

1. ヒトは環境中の細菌やウイルスなどのA型抗原およびB型抗原様因子に反応して抗Aまたは抗Bを自然に産生する。
2. 臍帯血中の抗A、抗Bは、大部分が母親由来のIgG型抗体
3. 児自身が**抗体を産生**し始めるのは免疫グロブリン (IgM) の産生時期と並行して**生後3~6ヶ月**からで、約1年後にはほとんどの児に抗体が検出。
4. 抗体価のピークは5~10歳頃でその後は漸次加齢と共に低下し、**高齢者ではピーク値の1/4**になる。

ランドシュタイナーの法則

オモテ検査			ウラ検査			総合判定
抗A	抗B	判定	A ₁ 血球	B血球	判定	
+	0	A型	0	+	A型	A型
0	+	B型	+	0	B型	B型
+	+	AB型	0	0	AB型	AB型
0	0	O型	+	+	O型	O型

RhD血液型



RhD血液型 判定

直後判定			D陰性確認試験			選択すべき血液型
抗D試薬	Rhコントロール	判定	抗D試薬	Rhコントロール	判定	
+	0	D陽性	不要			D陽性 (D陰性も可)
0	0	判定保留	0	0	D陰性	D陰性
			+	0	weakD partialD	
+	+	判定保留				※D陽性またはD陰性

※Rhコントロールが陽性になった原因を排除し、再検査を行った結果で選択する

Rhコントロールが 陽性になる原因

1. 寒冷凝集素（I g M型抗体）

⇒ 赤血球を37℃の生理食塩液で数回洗淨し、赤血球浮遊液を37℃ に保ちながら再検査

2. 直接抗グロブリン試験陽性：温式自己抗体

3. 抗Dによる新生児溶血性疾患（HDFN）における異常反応

⇒ ・ IgMタイプのモノクローナル抗体で再検査
・ 解離試薬を用いて赤血球に感作している自己抗体（I g G型抗体）を解離し再検査

RhD血液型 判定上の注意点

1. 専用のRhコントロールを使用する！
⇒患者の赤血球に抗体が感作している場合を考慮し、原則として必要。
2. 直後判定が陰性の場合には判定保留として、D陰性確認試験を実施する
⇒D陰性とweak Dを鑑別するために必要



※血液製剤は、直後判定が陰性の場合にはRhD陰性血を準備する。

機器の確認

1. 判定用遠心機の管理

- ・ 回転数 (タコメーターを使用し確認)
- ・ タイマー
- ・ 異常音、バランス



2. 自動血球洗浄遠心機

- ・ ノズル、ボトル、ラインなどのメンテナンス・洗浄
- ・ 生理食塩液の分注量や洗浄後の残量の点検
- ・ 洗浄遠心機の設定条件の確認



3. 恒温槽

- ・ サーモスタットの温度コントロールの動作状態
- ・ 別の温度計による温度点検と記録



試薬・検体の分注

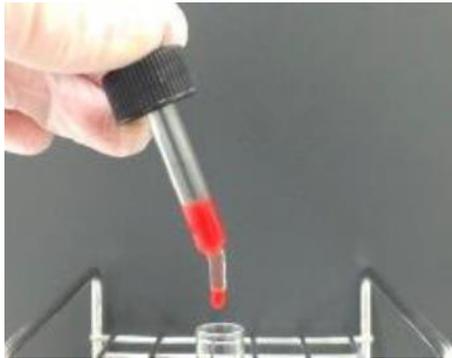
1. 試薬は室温に戻してから使用する。



2. 血漿および試薬を入れる時は、スポイトおよびドロPPERを垂直に立て、管壁に付けないよう滴下する。

※赤血球浮遊液の濃度（3～5%）は、赤血球試薬の色調を参考にして調製する。

- 赤血球試薬や赤血球浮遊液は必ず使用時によく混和し、管底に赤血球が残っていない事を確認してから用いる。
- 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。

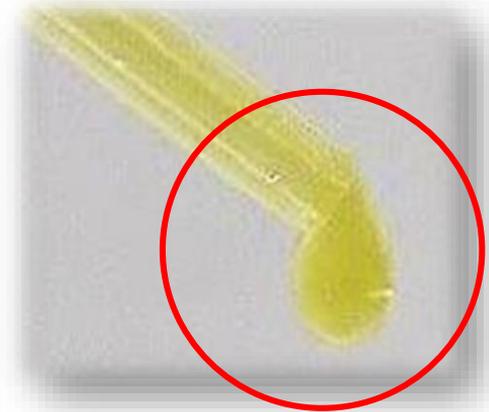
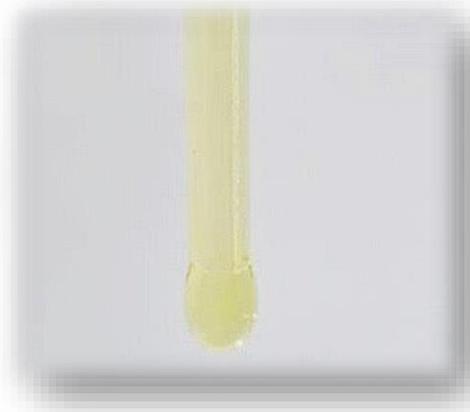


輸血検査時のポイント

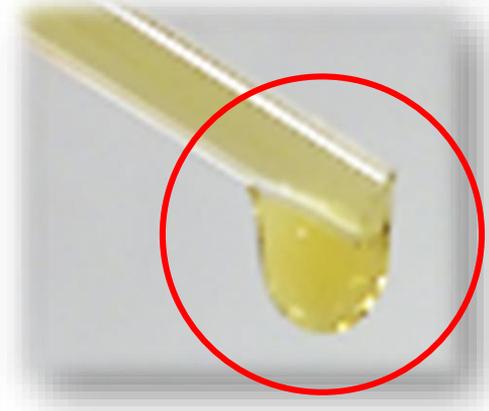
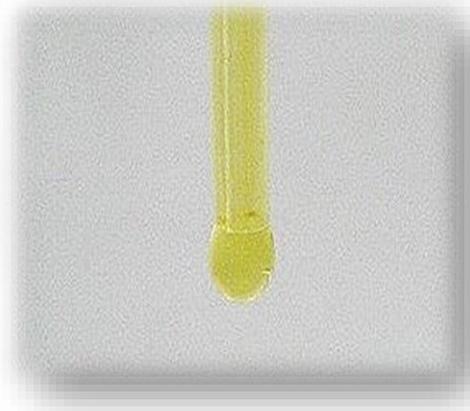
垂直にした場合

傾斜した場合

樹脂製



ガラス製



輸血検査時のポイント

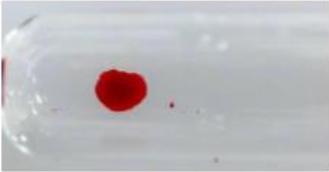


検体分注に使用しているスポイトの口径の違いも確認していますか？

実際の検査 試験管の傾け方

1. 遠心済みの試験管を静かに取り出し、微小凝集塊を見逃さないため、**セルボタンを上**にして、ゆっくり試験管を**傾ける**。
2. セルボタンから流れる赤血球凝集塊の有無を確認する。
3. 試験管底から赤血球塊がすべて流れた時点で試験管内の色調、凝集塊の大きさを観察し、判定する。

凝集力価

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	

実際の検査 判定のこつ

1. 検査目的や力量に合わせて試験管を振る。
たとえば、オモテ検査では抗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Rhコントロール用の2本、
抗体スクリーニングでは4本一緒、あるいは
2本ずつ2回に分けて凝集を観察するのが望ましい。
2. ビューボックスまたは背景の白く明るい場所で
判定する。
3. 感染を防止するため、目の高さより低い位置で
観察する。

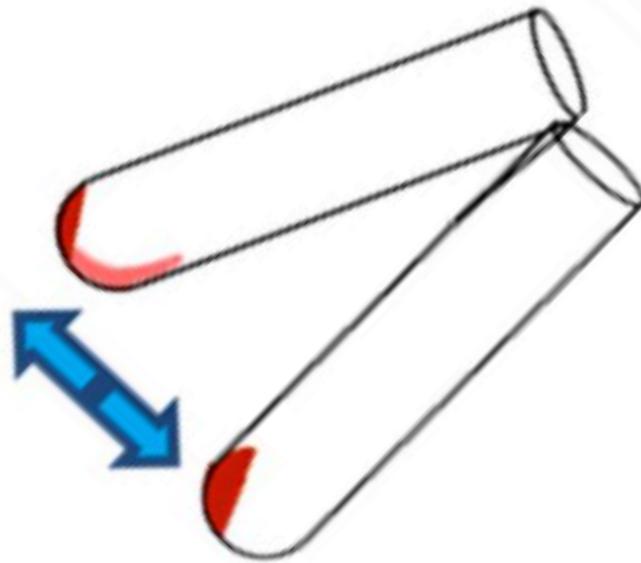
試験管の振り方 1

1.セルボタンを上に向ける



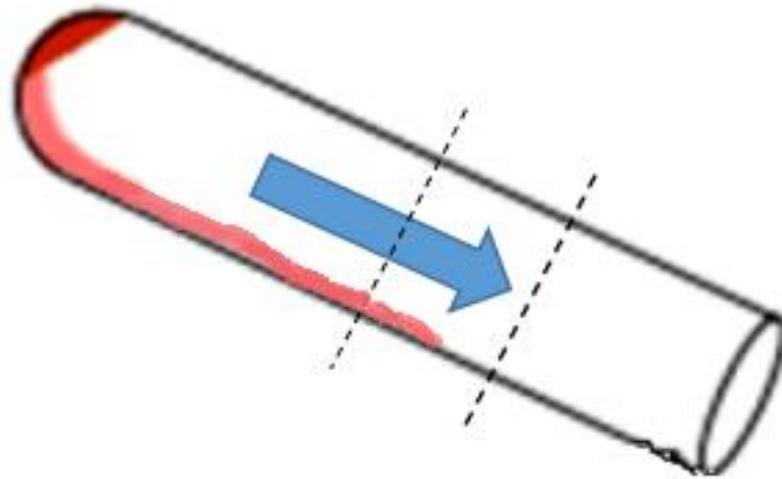
試験管の振り方 2

2.試験管を静かに傾けながら



試験管の振り方 3

3. 試験管の半分から2/3まで流す



試験管の振り方 4

4. ゆっくり垂直まで戻す

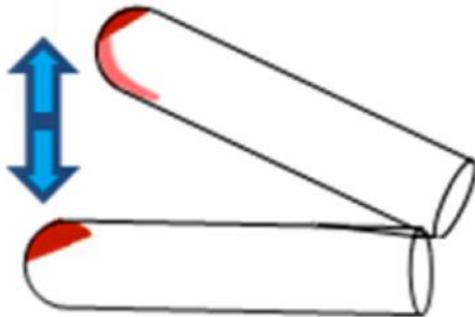


試験管の振り方 まとめ

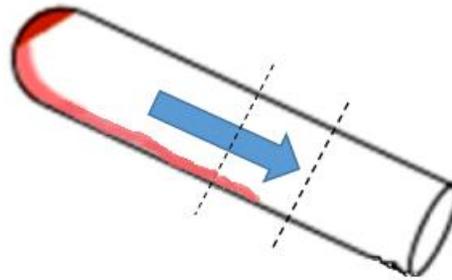
1.セルボタンを上に向ける



2.試験管を静かに傾けながら



3.試験管の半分から2/3まで流す



4.ゆっくり垂直まで戻す



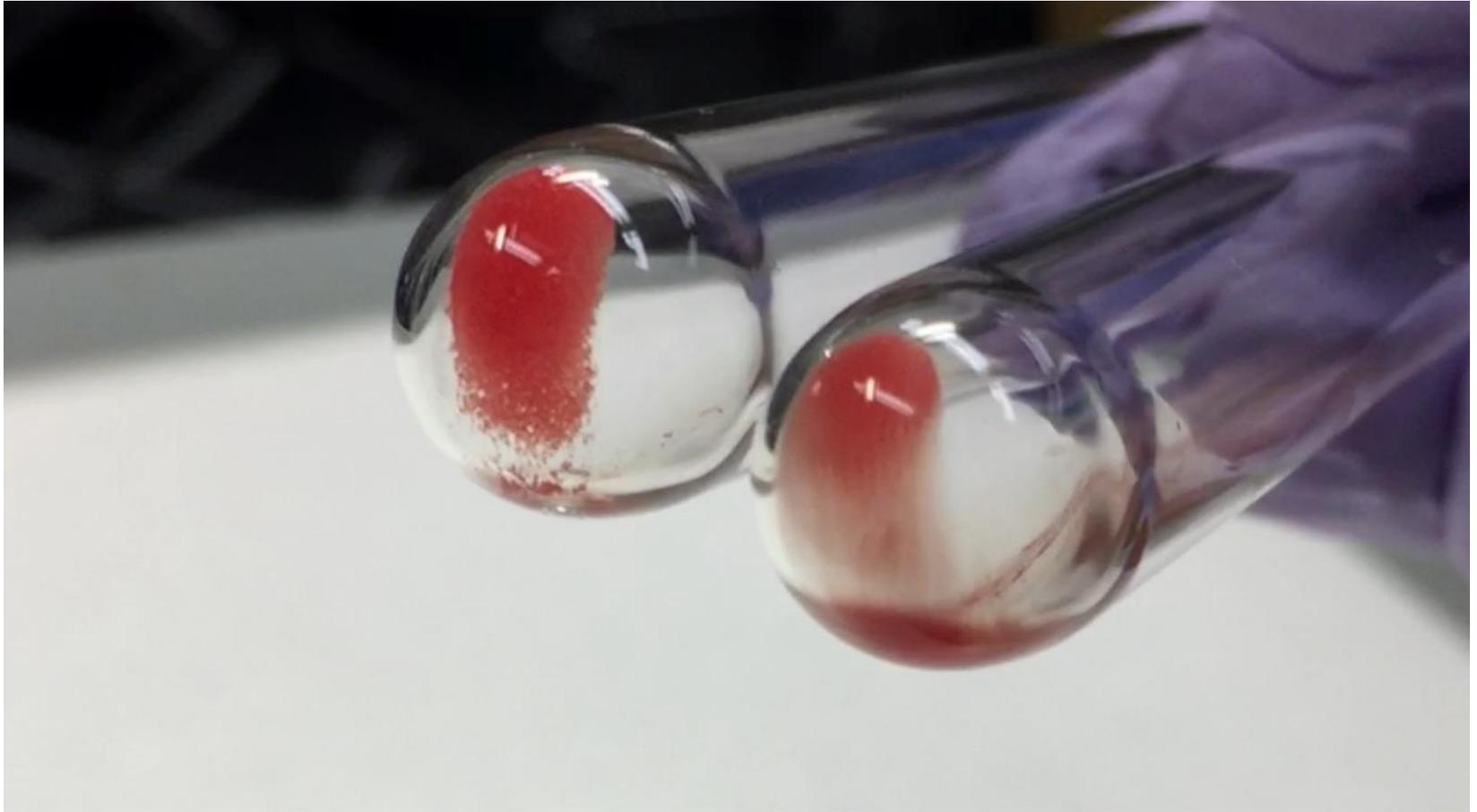
5. 3と4をセルボタンが管壁から無くなるまで繰り返す

6.判定する

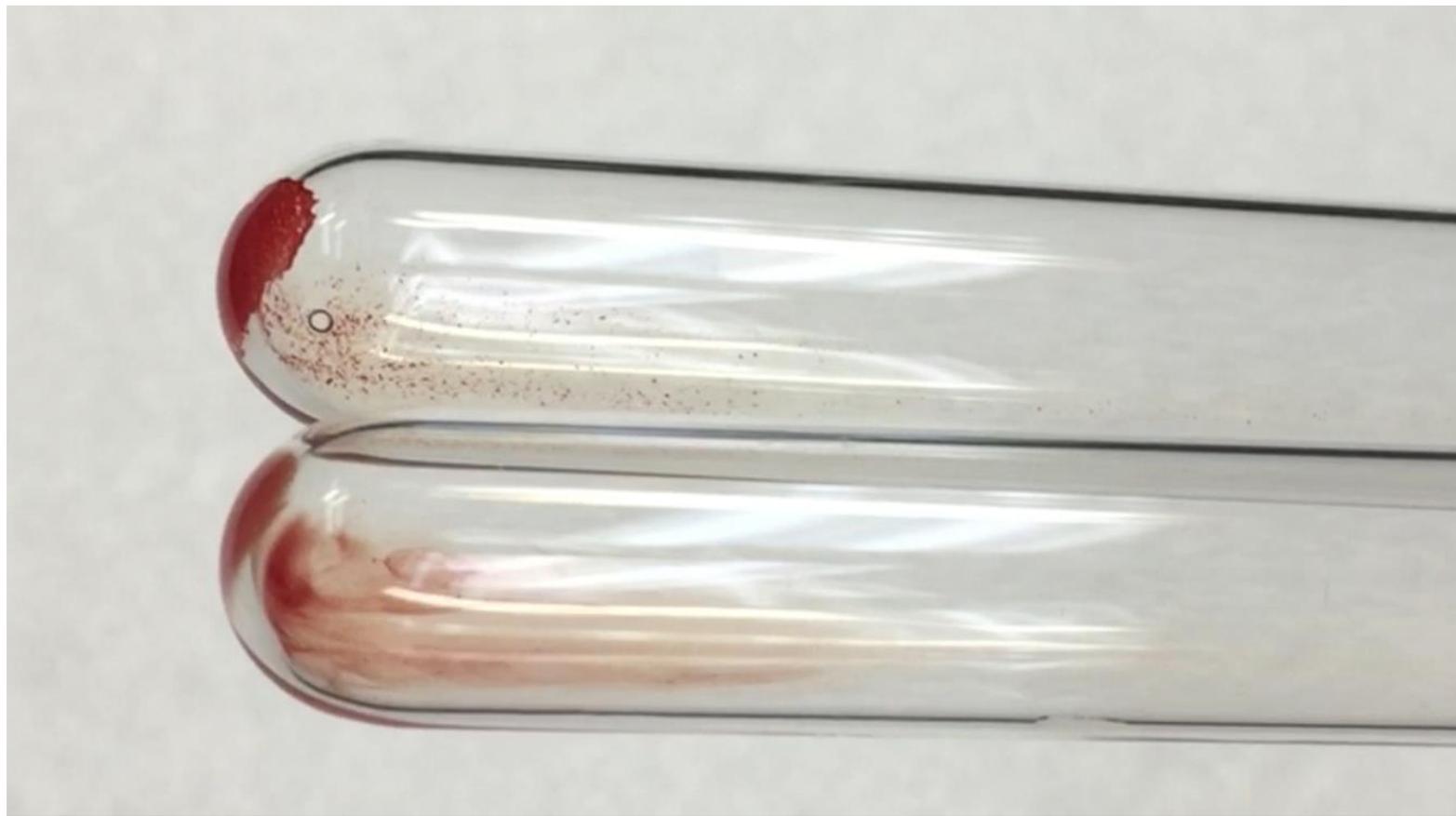


上から見た図

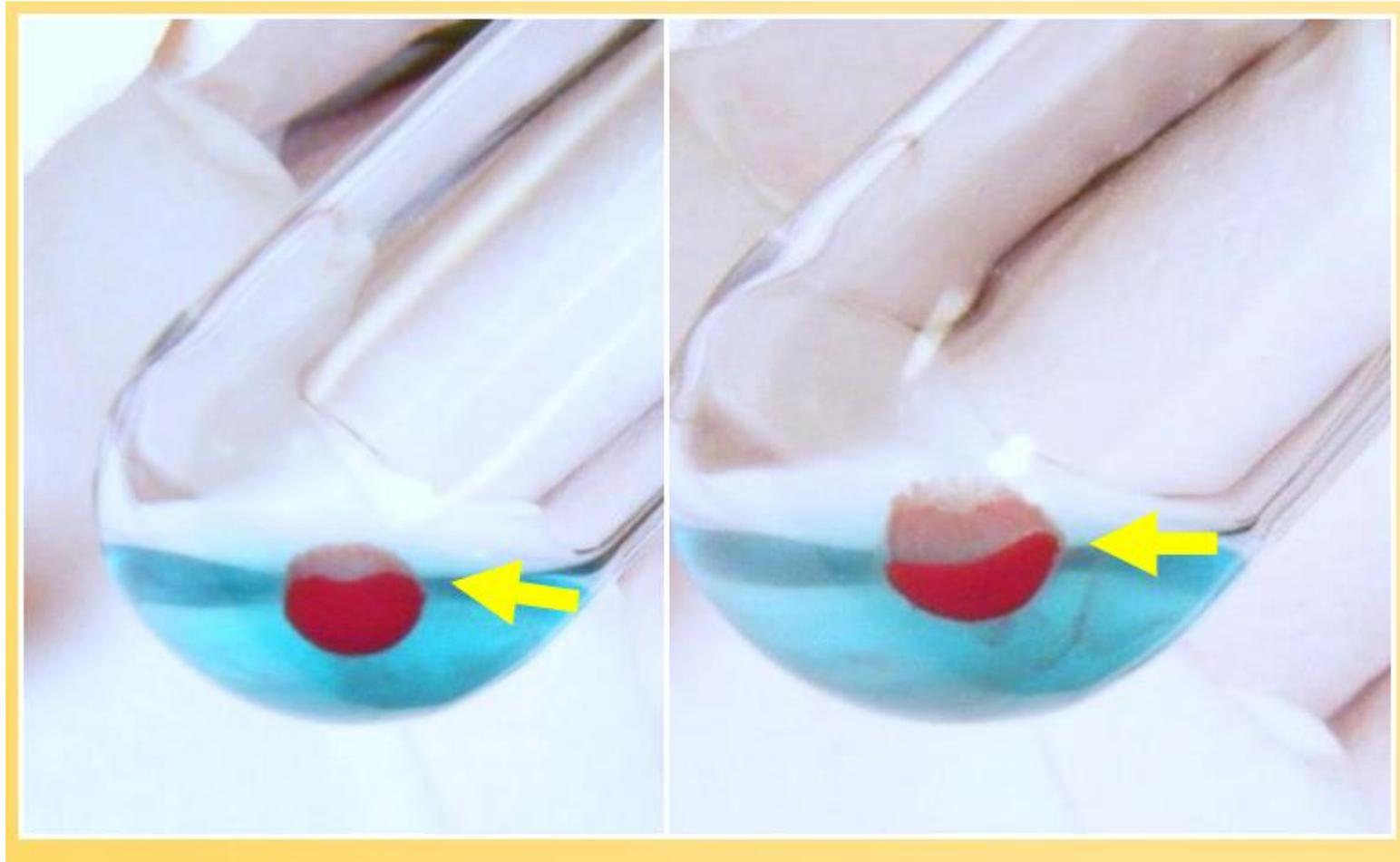
振り始めのセルボタンの崩れ方



振り始めのセルボタンの崩れ方 真上



部分凝集の観察のコツ



実際の検査 分注

1. 患者名、検査項目、試薬名などを試験管に明記する。
 - ・ 試験管はワークシートの記入欄に準じて並べる。
2. 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する。
 - ・ 分注忘れを目視確認できる様に色の薄い物から添加
 - ・ 分注時は、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。
 - ・ 赤血球試薬や赤血球浮遊液は使用時によく混和し、濃度を均一にしてから用いる。
3. 赤血球浮遊液を作製する際の濃度は、ウラ検査用のA1・B赤血球を参考にする。

血液型異常反応出現時の 検査の進め方

1. まず、手順を確認しながら**再検査**！
2. 再現性があったら原因究明へ
3. 操作法のチェックも忘れずに
4. 患者情報も入手する
5. 「？」を抱くことが重要で、一人で解決しようとせず、担当技師に指示を仰ぐ



オモテ検査、ウラ検査との結果に矛盾があれば、結果はそのまま記録として残し、不一致の原因が解決されるまでA B O血液型の判定は保留とする。

ABO血液型再検基準

1. オモテ検査でどのような反応が、**再検査**となるか？

- ・ 反応態度：**3+以下**（試験管法）

★使用している試薬の添付文書に従う

- ・ **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

2. ウラ検査でどのような反応が、**再検査**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。（試験管法）



ABO血液型異常反応の原因

オモテ検査側の要因

異常反応	考えられる要因または病態
反応がない 弱い	新生児, 高齢者 低・無ガンマグロブリン血症 異型輸血後 異型造血幹細胞移植後
異常な凝集	亜型 冷式不規則抗体 寒冷凝集素症 連鎖形成 高分子製剤輸注後 試薬に含まれる添加物に反応する抗体
(IAT)	新生児の母親由来IgG型抗A, または抗B 免疫グロブリン製剤由来IgG型抗Aまたは抗B 異型造血移植後のPLS

ABO血液型異常反応の原因

ウラ検査側の要因

異常反応	考えられる要因または病態
反応がない 弱い	亜型 疾患による一時的な抗原量の低下 型物質の異常増加による試薬の抗体中和
部分凝集	亜型 キメラ、モザイク 異型輸血後 異型造血幹細胞移植後 胎児母体間輸血症候群(FMT)
異常な凝集	汎凝集反応 後天性B (acquired B) 寒冷凝集素による感作

オモテ・ウラ検査不一致時の検査の進め方

オモテ・ウラ検査の結果が不一致であった場合



操作手順に従って正しく実施したかを確認



正しい手順でオモテ・ウラ検査を再度実施し、結果を確認



オモテ・ウラ検査の結果が一致した場合



オモテ・ウラ検査が
不一致であった原因を究明



検査手技で不適切な部分があれば修正し
再検査

「輸血療法実施に関する指針」では、同一検体について異なる2人の検査者がそれぞれ独立に検査し二重チェックするように努めることとなっている。



判定



オモテ・ウラ検査の結果が不一致の場合



患者情報を確認
年齢、性別、診断名、輸血歴、妊娠歴、分娩歴、
移植歴、病歴、血液型検査履歴、治療方法、投与
薬剤、他の検査データ、採血方法 等

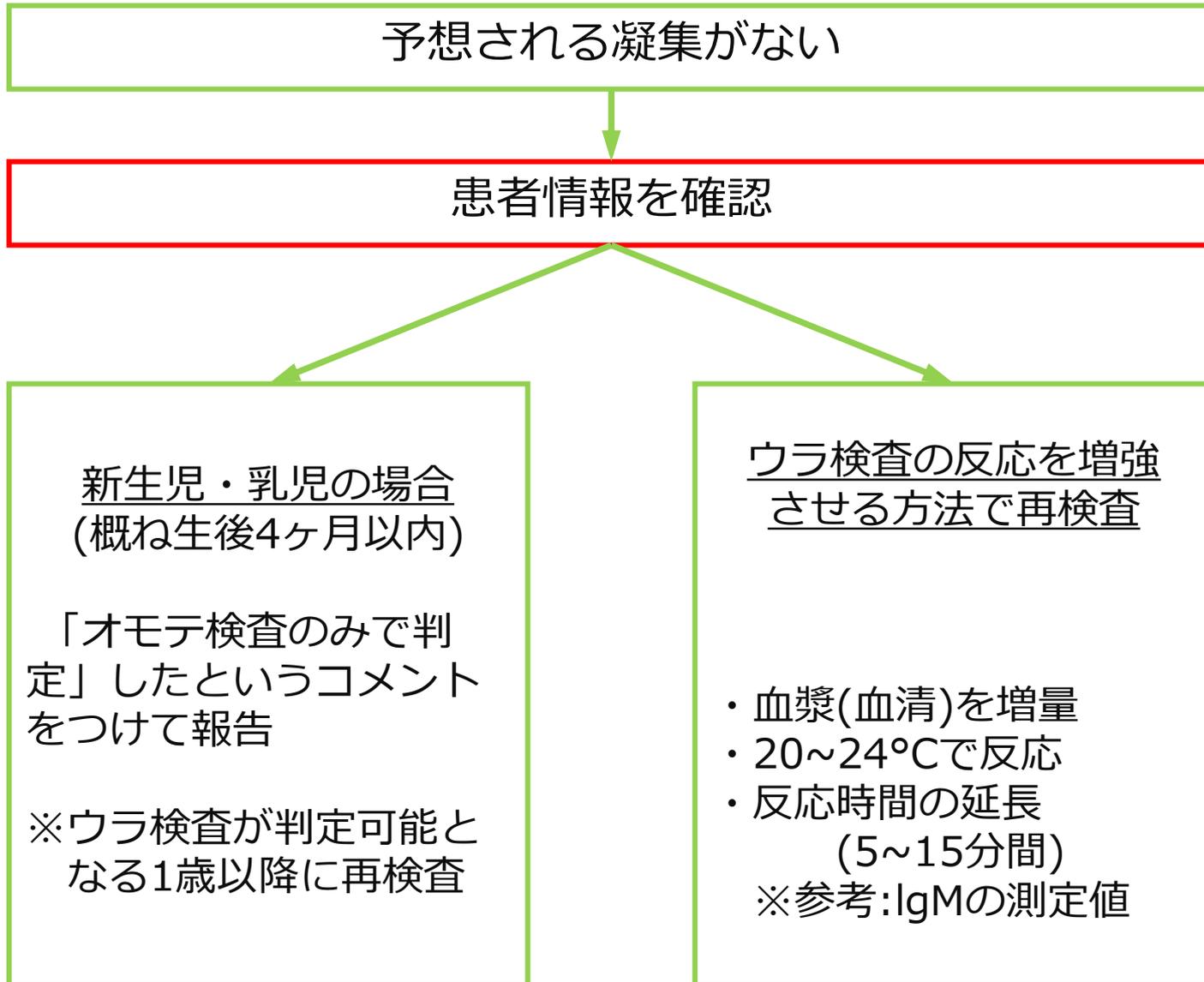


オモテ・ウラ検査の反応から赤血球、血漿
(血清)のどちらに原因があるかを推定し、
Ⅶの手順を参考に精査



オモテ・ウラ検査不一致時

一オモテ検査が正しいと仮定した場合のウラ検査の進め方一



オモテ・ウラ検査不一致時

一オモテ検査が正しいと仮定した場合のウラ検査の進め方

予想しない（余分な）凝集がある

患者情報を確認

不規則抗体検査（生理食塩液法）を実施

<市販赤血球試薬に対する特異性あり>

抗P1、抗Lewisの場合

- ・各型物質で抗体を吸収後再検査
- ・対応抗原陰性のA₁赤血球、B赤血球で再検査

抗M、抗Nの場合

- ・対応抗原陰性のA₁赤血球、B赤血球で再検査
- ・ウラ検査にて、プロメリン液を1滴添加し、室温で5~15分間反応後、遠心判定

<市販赤血球試薬に対する特異性なし>

連鎖形成の場合

- ・顕微鏡で赤血球の連鎖を確認
- ・生理食塩液置換法で連鎖の消失を確認

寒冷凝集素の場合

- ・血漿(血清)を37°C 5分間加温後再検査
- ・自己抗体を吸収後再検査
- ・寒冷凝集素の測定

市販赤血球試薬と反応する場合

- ・A₁赤血球、B赤血球を生理食塩液で洗浄後再検査

連銭形成を消失させる方法

☆生理食塩液置換法

1. ウラ検査用の試験管を遠心する
2. 赤血球が沈んでいる状態で血漿（血清）を取り除く
3. 沈んでいる赤血球をくずさないように生理食塩液を2滴加える
4. 判定する
(連銭形成の場合には陰性)



寒冷凝集素による凝集を 消失させる方法 オモテ検査

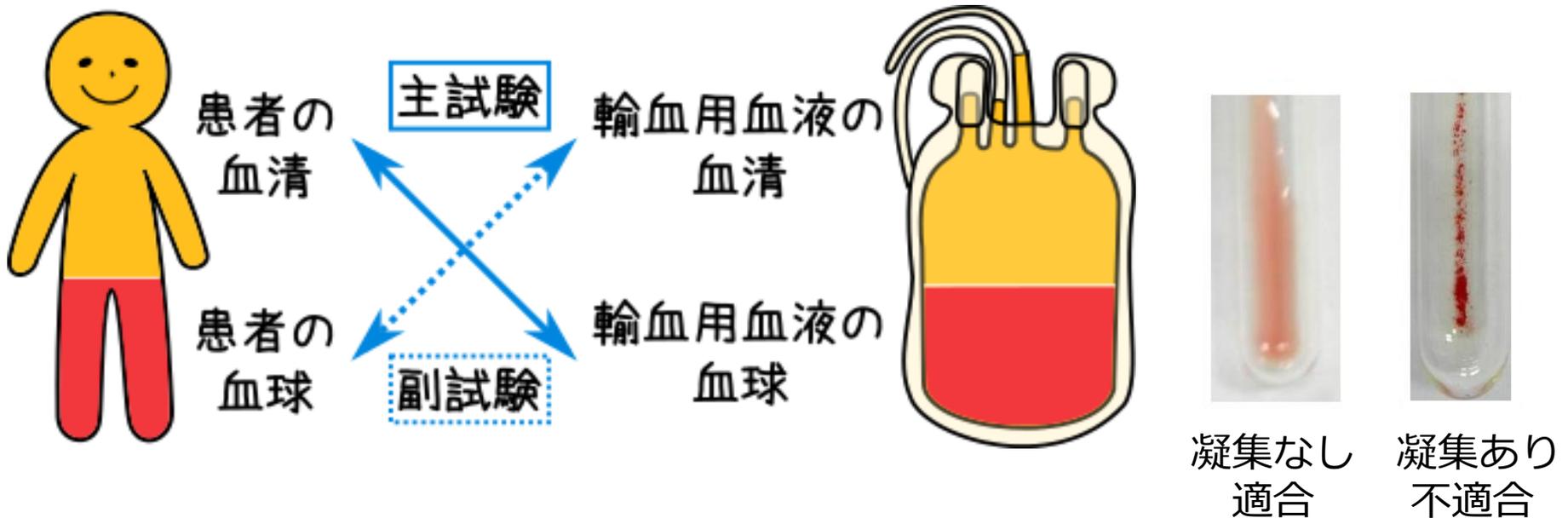
1. 寒冷凝集素は、37°C程度での抗体活性は低いいため、**37°Cに加温した生理食塩液で洗浄**することにより、赤血球上から除去することができる
2. 寒冷凝集素の抗体価が高い場合は**洗浄操作を複数回実施する**。または、40°C程度まで加温した生理食塩液を洗浄に用いるなど条件を工夫する
3. 寒冷凝集素が高力価の場合は、採血時に採血器具を加温し、採血管も40°C程度まで加温したお湯の中に入れて搬送する。遠心機のバケツも加温しておき、寒冷凝集素が感作する前に、手早く血漿(血清)と赤血球を分離する

寒冷凝集素による凝集を 消失させる方法 ウラ検査

1. 患者血漿と試験管に取り分けたA1・B赤血球、検査用の試験管を予備加温（37°C10分程度）し、検査用試験管に分注後、冷やさない様に遠心し判定する。影響が残る場合は、遠心後に37°C10分程度加温してから判定する。
2. 寒冷凝集素の抗体価が高い場合は洗浄したO型赤血球で患者の寒冷凝集素を吸収する。
患者血漿（血清）と洗浄O型赤血球を等量混合し、4°Cで時々攪拌しながら30分程度反応させ、遠心して上清を使用する。1回の操作で吸収しきれない場合は新しい洗浄O型赤血球を用いて吸収を繰り返す。

交差適合試験

輸血用血液製剤と患者血液との間に血液型抗体に起因する抗原抗体反応が起こるかをあらかじめ試験管内で検査し、血液型不適合による副作用を未然に防止する検査



不適合の場合は、なぜ凝集したかの原因を追加で検査

準備

1. 輸血歴・妊娠歴がある場合は採血後3日以内の検体で検査を実施することが推奨される。
2. 血液型検査に用いたものとは異なる検体で検査を実施する。
3. 間接抗グロブリン試験に用いる試薬
→反応増強剤（LissもしくははPEG）
抗グロブリン試薬

※より安全な輸血のためには、あらかじめ不規則抗体スクリーニングを行うことが望ましい



反応増強剤の種類

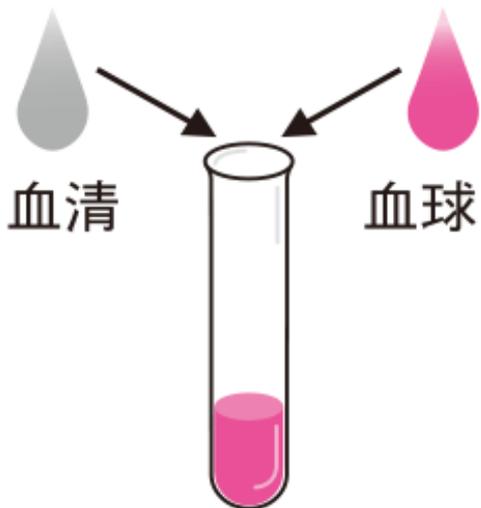
反応増強剤	原理	特徴
反応増強剤 無添加 (37℃60分)	抗原抗体複合体の 産生は37℃60 分で最高点に達す る	<ul style="list-style-type: none">一部のIgG抗体を検出できない反応増強剤の添加によって 非特異反応を起こす場合に用いる反応時間：60分
低イオン強度 溶液(LISS)	反応液中のイオン 強度を下げる	<ul style="list-style-type: none">反応時間が短縮できる反応時間：10～15分
ポリエチレン グリコール溶液 (PEG)	PEGの脱水効果に よる抗体濃縮効果	<ul style="list-style-type: none">反応時間が短縮できる多特異性抗グロブリン試薬では 非特異反応を起こすことがある自己抗体を検出しやすい反応時間：10～15分

交差適合試験

主試験

受血者

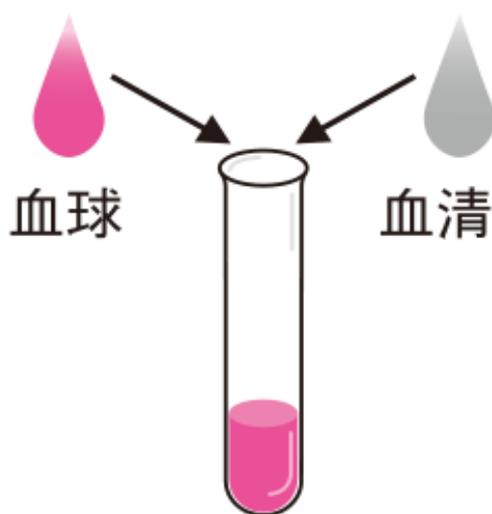
供血者



副試験

受血者

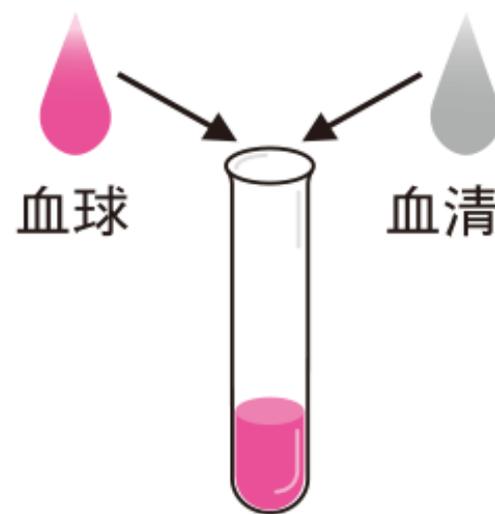
供血者



自己対照

受血者

供血者



※副試験は、以下の条件を満たしている場合には省略可能

- ・患者の血液型が2回以上異なる時点で採血された検体で2重チェックにより確認されている場合。
- ・赤十字血液センターから供給される輸血用血液製剤を用いる場合。

結果の解釈

主試験	副試験	自己対照	判定	輸血
-	-	-	適合	可能
+	-	-	不適合	輸血してはいけない
-	+	-	不適合	ほかに選択の余地がなければ注意しながら輸血する
-	+	+	不適合	ほかに選択の余地がなければ注意しながら輸血する
+	-	+	不適合	輸血してはいけない
+	+	+	不適合	輸血してはいけない

原則として、主試験の結果が I A T にて **陰性** の場合のみ適合とする。

緊急時など O 型使用の場合 (異型適合血)

緊急時の異型適合血

患者血液型	赤血球液	新鮮凍結血漿 血小板濃厚液
A	A > O	A > AB > B
B	B > O	B > AB > A
AB	AB > A = B > O	AB > A = B
O	Oのみ	全型適合
未確定	O	AB

生理食塩液法での陽性時の対応

1. **検体違い**：検体の血液型を確認、再採血し再検査
2. **血液型違い**：供血者・患者の血液型を確認
3. 室温で反応する**不規則抗体の存在**：
不規則抗体検査を実施
4. **寒冷凝集素・冷式自己抗体**（自己対照陽性）
37℃5分加温後判定 →凝集が**消失**することを確認
4℃ 5分放置後判定 →凝集が**増強**することを確認
5. **連鎖形成**（自己対照陽性）：生食置換法を実施

間接抗グロブリン法での 陽性時の対応 1

1. 不規則抗体の存在

- 不規則抗体検査を実施し、抗原陰性血で再検
- 不規則抗体陰性
→低頻度抗原に対する抗体を示唆

2. 供血者血球が直接抗グロブリン試験陽性

- 供血者血球の直接抗グロブリン試験を実施

いずれも、不規則抗体の検査ができない場合は、他の製剤で交差適合試験を行ってみる。

間接抗グロブリン法での 陽性時の対応 2

3. 自己対照も陽性

→自己血球の直接抗グロブリン試験を実施

DAT陽性の場合、吸収試験を実施し、

同種抗体の有無を確認する必要がある。

この時重要なことは、溶血所見があるか？ないか？

同種抗体陽性 ⇨ 抗原陰性血で対応

同種抗体陰性 ⇨ 慎重に投与

不規則抗体スクリーニング陰性 交差適合試験陽性の原因

原因	確認方法
A B O不適合	患者、血液製剤のABO血液型の再確認
供血者が直接抗グロブリン試験陽性	血液製剤の直接抗グロブリン試験の実施
母親由来の移行抗A,抗B (IgG抗体)	患者年齢、母親ABO血液型の確認
患者が亜型で不規則抗A1, 抗Bを保有	患者の亜型検査、複数本で交差適合試験
移植ドナー由来B細胞による抗A,抗Bの産生 (passenger lymphocyte syndrome)	移植歴およびドナーABO血液型の確認
患者が量的効果や抗原量に差異を示す抗原に対する不規則抗体を保有しており、供血者血球上にスリーニング血球より強く抗原が発現している場合	スクリーニング血球にホモ接合体や抗原が強陽性の血球を使用する
グロブリン製剤や、ABO不適合血小板などの輸注による抗A,抗Bの獲得	患者の輸血歴、薬剤投与歴を確認
技術的な誤り	手順および使用器具が適切か確認の上で、再検査を実施
患者が低頻度抗原に対する抗体を保有	上記であげた原因がすべて否定された場合に考慮

交差適合試験の限界

1. Rh血液型の誤判定・不適合は防止不可
2. 血液型抗原による免疫は防止不可
3. 遅発性溶血性副作用を防止出来ないことがある
4. 適切な検査法でなければ抗体検出不可
(現法で全てが網羅されるわけではない)
5. 操作ミス、検体・試薬の入れ忘れは防げない

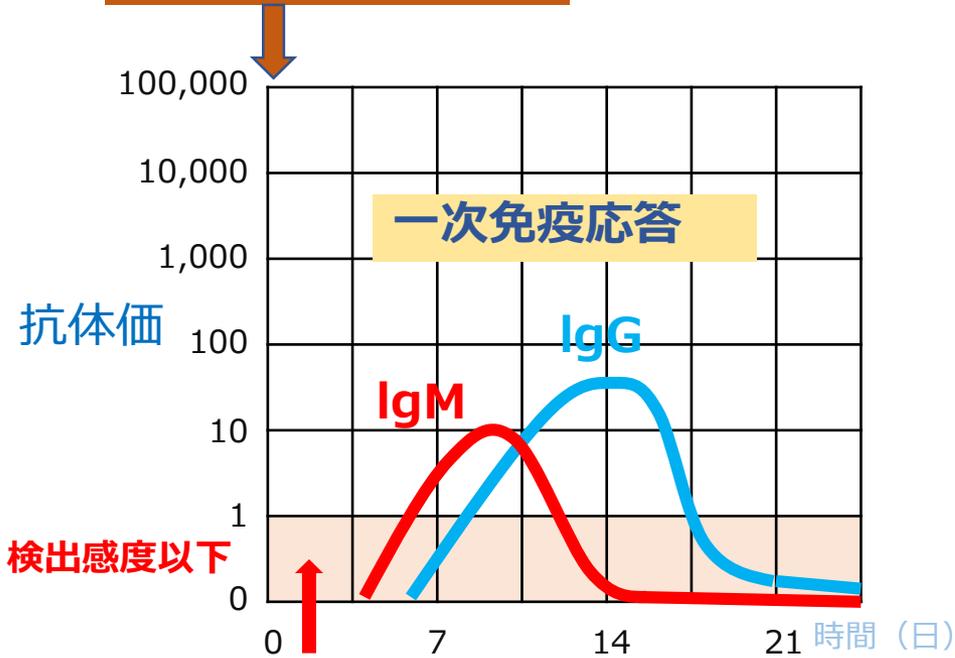
過去に一度でも不規則抗体が
検出された患者さんには
適合血（抗原陰性血）が
必要です！！



抗体の力価

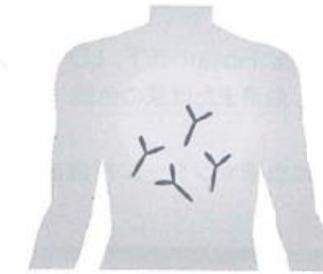


抗原陽性血輸血
(一次免疫)



血漿中に抗体が存在していても
検出不可

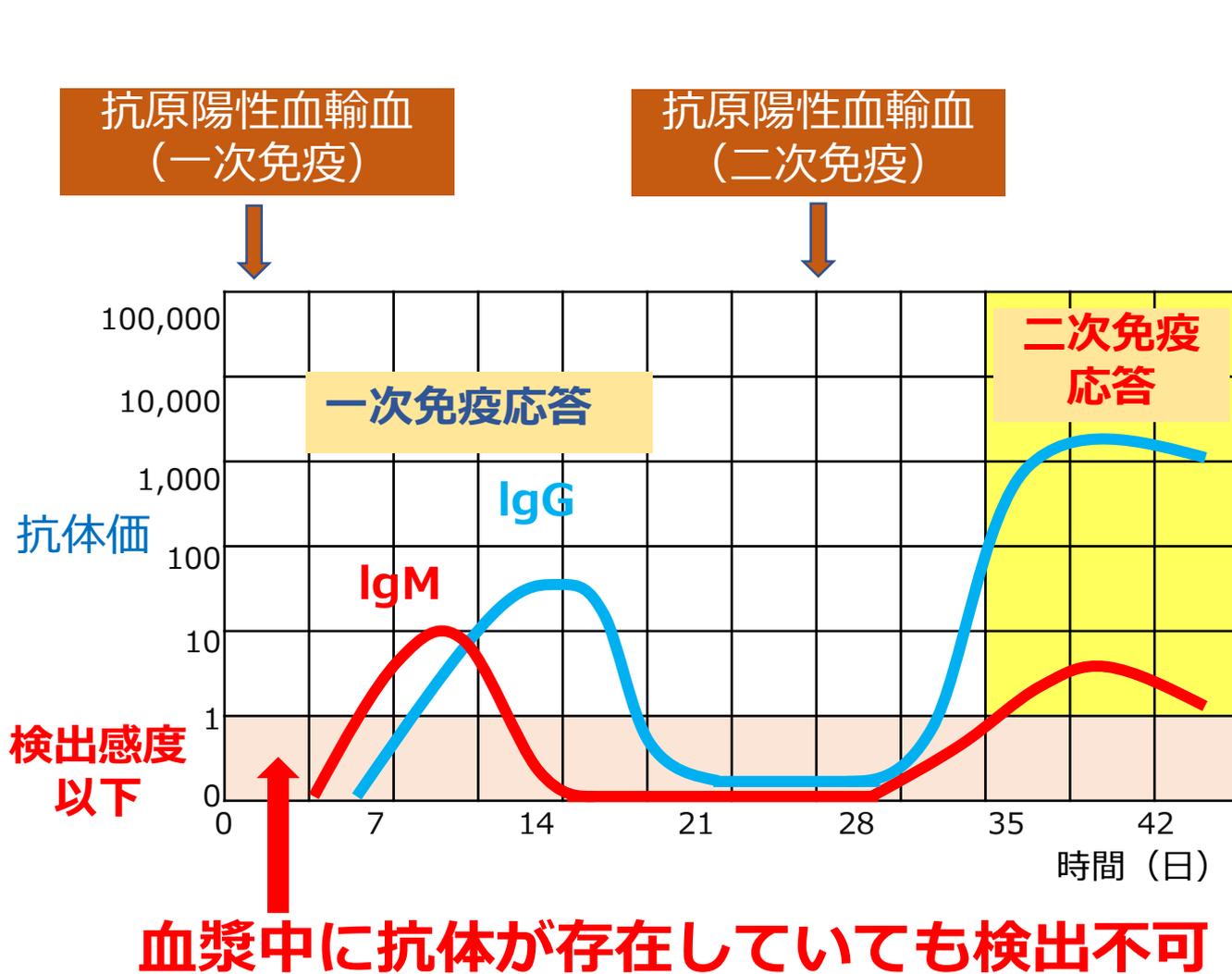
数週間



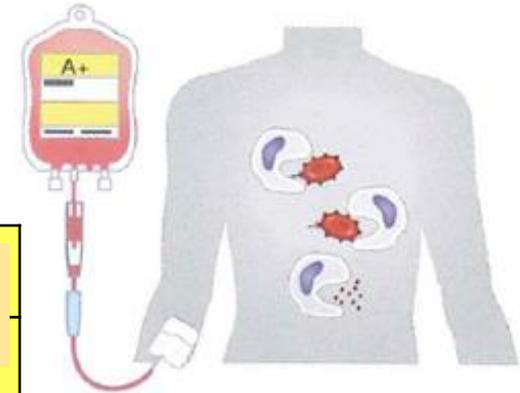
数週～数年



二次免疫応答



E抗原 (+) RBC

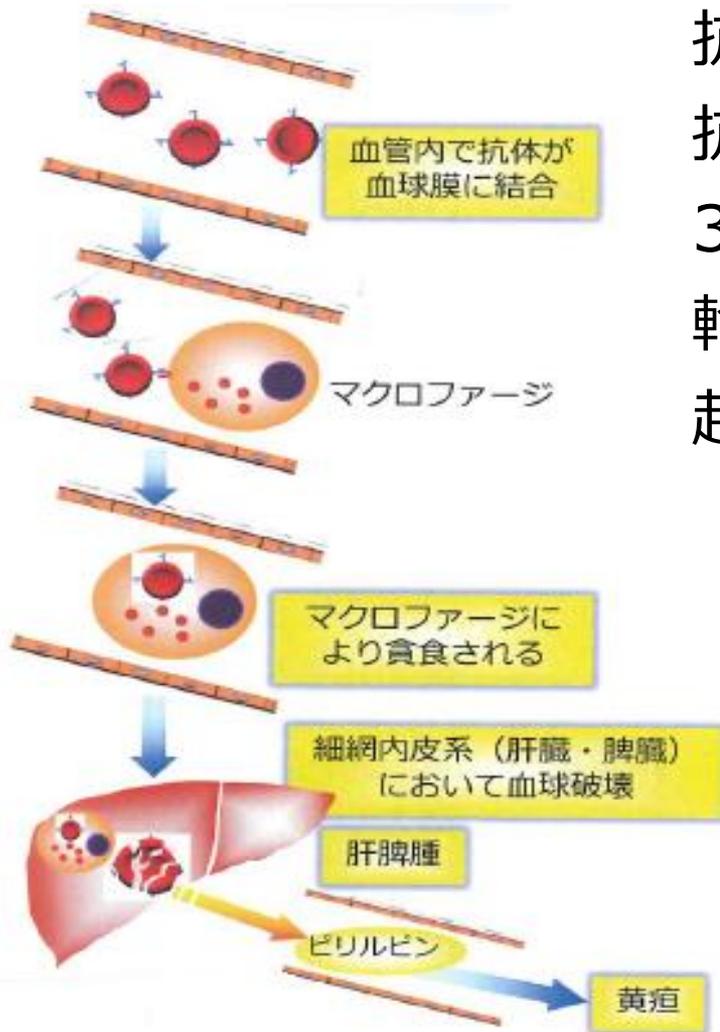


輸血による
E抗原の再刺激
抗Eの急激な産生
DHTRの諸症状

遅発性溶血性副作（DHTR）

抗体価が感度以下になり、輸血された抗原陽性の赤血球による抗原刺激で3～14日程度で**抗体が急激に増加**する輸血された赤血球が壊され**溶血反応**が起こる。

- ・ 輸血後24時間以降に発症
- ・ 症状：発熱、貧血、黄疸
- ・ 検査：Hb低下、LD・間接Bilの上昇
ヘモグロビン尿
- ・ **Rh・Kidd・Duffy**血液型に対する抗体が多い。



判定に影響する操作ミス 間接抗グロブリン法

誤操作	判定
検体の分注忘れ、量不足	偽陰性
反応増強剤の過不足	偽陰性、偽陽性
血球試薬の過不足	偽陰性
感作温度の異常	偽陰性
感作時間不足	偽陰性
感作時間過剰	PEG使用時は偽陽性
洗浄時の生理食塩液の不足	偽陰性
判定遠心時の回転数不足、時間不足	偽陰性
判定遠心時の回転数過剰、時間過剰	偽陰性、偽陽性

交差適合試験の精度管理

1. Ig G感作赤血球を使用した凝集確認
 - ・ 抗ヒトIg G試薬の入れ忘れ・劣化の確認
 - ・ 洗淨操作の確認
2. 陽性コントロール、陰性コントロールの実施
 - ・ 検査工程が正しく行われたかの確認
 - ・ 弱陽性の凝集の確認

コンピュータークロスマッチ

交差適合試験の代わりにコンピューターを用いて、患者と輸血用血液製剤の血液型（ABO、RhD）を照合する事で、適合性を確認する方法。

人為的な誤りの排除と手順の合理化,省力化が可能。

【条件】

- 1) 結果の不一致や輸血用血液製剤の選択の誤りを警告できること
- 2) 患者の血液型が2回以上異なる時点で採血された検体により確認されていること
- 3) 赤血球製剤の血液型が再確認されていること
- 4) 新生児および4か月以内の乳児において、コンピュータークロスマッチは禁忌である

まとめ

- **すべての検査は、基本に忠実に！**
- 異常な反応を認めた場合は手順を再確認しながら再検を行う。
- 使用機器は精度管理やメンテナンスを適切に行い維持管理する。
- 対応に困ったり、悩んだときは**早めに**輸血担当者の指示を仰いでください！