

輸血テクニカルセミナー2015

実技テキスト

Ver1.2



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 28 年 1 月 改正

平成 28 年 3 月 19・20 日

東邦大学医学部

実 技 編 ー 指導のポイント ー

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)〕
試薬・器具	試薬および器具類が揃っているか確認する	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) <ol style="list-style-type: none"> 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) 洗浄ビン：樹脂製のもの 5) タイマー
		器具類の破損などはないか？	
		試薬の使用量ならびに使用期限を確認したか？	

実技を行う前に

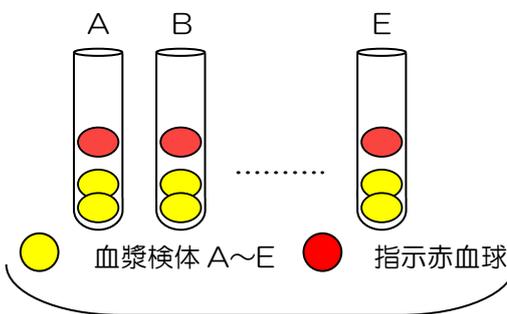
指導事項		具体的な項目	回答〔主な引用文献：輸血のための検査マニュアル（TM）、疑義解釈集（QA）〕
機器	事前に機器類が正しく作動するかチェックする		3. 機器の精度管理（TM-p18、参照） <ul style="list-style-type: none"> 1) 判定用遠心機の管理 <ul style="list-style-type: none"> (1) 回転数(可能な場合) (2) タイマー (3) 異常音、バランス 2) 自動血球洗浄遠心機 <ul style="list-style-type: none"> (1) ノズル、ボトル、ラインなどのメンテナンス (2) 生理食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 3) 恒温槽 <ul style="list-style-type: none"> (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
	機材の基本的な操作を、確認する		
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に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】

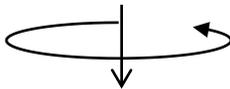
- ◆ 目的：施設内で凝集の強さや判定基準の統一を図ることは、とても重要である。術者間差を縮小させる方法として、典型的な反応強度を示すよう調製した試料を用いた「凝集判定の目合わせ」が効果的である。

◆ 操作手順：

- (1) 試験管を5本準備し、A～Eの記号を書く。
- (2) A～Eの各試験管に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。



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

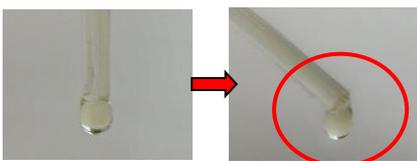
凝集反応の判定には血液型判定用遠心機を使用することが望ましい。

- ☞ 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
 - ・試験管の操作方法(傾け方)など

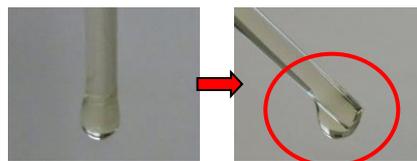


スポイトを用いて滴下する時、角度により滴下量が変わる。

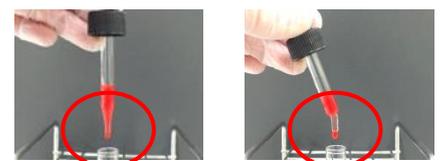
樹脂製



ガラス製



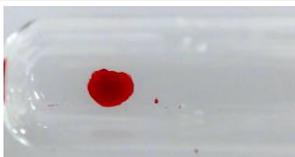
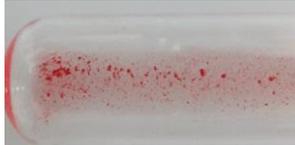
試薬スポイト



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.1.3 から引用

凝集判定の目合わせ

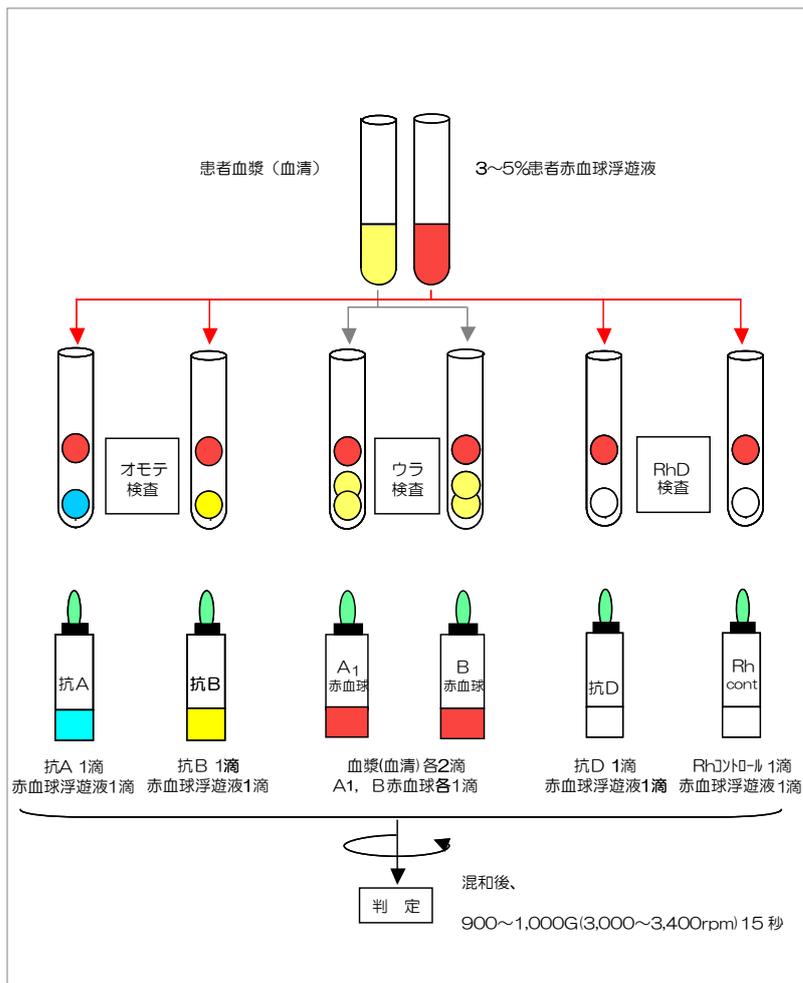
指導事項		具体的な項目	回答〔主な引用文献：輸血のための検査マニュアル (TM)、疑義解釈集 (QA)〕
分注	試験管のマーキングや検体または試薬の分注もれなど、テクニカルエラーの防止	患者名、検査項目、試薬名などを試験管に明記したか？	<p>『検査用試験管の準備』(TM-p1、参照)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 検査用試験管には患者名(または識別番号)や試薬名を明記する(例えば、スクリーニング赤血球やパネル赤血球の番号など)。 2) 分注ミスを避けるため、検査用試験管は識別番号や試薬名などがよく見えるよう管口をきちんとそろえて試験管立てに準備する。
		抗体試薬、患者血漿(血清)、患者赤血球、赤血球試薬の順に分注したか？ 一定量を確実に分注したか？	<p>『試薬と検体の分注操作手順と留意点』(TM-p1、参照)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 分注忘れを目視確認できるよう、被検血漿(血清)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、血漿(血清)や解離液が溶血している場合は、血漿(血清)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。
		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？	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。
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	遠心架の No.1 から試験管をセットするよう心掛けているか？ また、順番に試験管立てに試験管を戻しているか？	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立てへ戻す位置を決めておくことは重要である。
		セルボタンを崩さないように静かに取り出しているか？	<p>『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	個人の力量に応じた試験管の判定が出来ているか？	検査目的や力量に合わせて試験管を観察することが大切である。たとえば、オモテ検査では抗 A 試薬、抗 B 試薬用の 2 本、ウラ検査では A ₁ 赤血球と B 赤血球用の 2 本、RhD 検査では抗 D 試薬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 回に分けて判定するのが望ましい。

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)〕
判定	判定時、凝集を確認する際の背景	イムノビューアまたは背景の白く明るい場所で判定しているか？	<p>『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。セルボタンを上にして、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>
	凝集判定を行う時の、試験管の操作	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るか？	
試験管を倒すようにゆっくり傾け、セルボタンの流れ方を観察しているか？			
重点項目	凝集の強さに差が出たときの、原因と対策	試験管の判定時の操作は適切であったか？	
		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：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>『赤血球試薬と赤血球浮遊液』(TM-p1、参照)</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 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。

【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。

☞ 複数の検体进行处理する場合、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、原則として必要である。
		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ため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？	『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	検体の取り違いを防止する方策を取っているか？	『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、被検血漿（血清）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、血漿（血清）や解離液が溶血している場合は、血漿（血清）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弱反応を示す要因などを総合的に考慮する必要がある。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)。 『異常反応に対する考え方』(TM-p13、参照)

※試験管法を前提としたものである

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)〕
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	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、直後判定が陽性か陰性かで決まる。直後判定が陰性の場合には D 陰性血を準備し、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-p5、Q2.1.11 および p6、Q2.1.12 参照)。
		Rh コントロール試薬を併用しているか？	自己抗体や寒冷凝集素等の影響を考慮し、原則として必要である。
		D 陰性確認試験を実施しているか？	D 陰性との鑑別するため、原則として必要である。

※試験管法を前提としたものである

《記入例》

通常の判定

オモテ検査			ウラ検査			ABO 判定
抗 A 試薬	抗 B 試薬	結果	A ₁ 赤血球	B 赤血球	結果	
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 判定
抗 A 試薬	抗 B 試薬	結果	A ₁ 赤血球	B 赤血球	結果	
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。

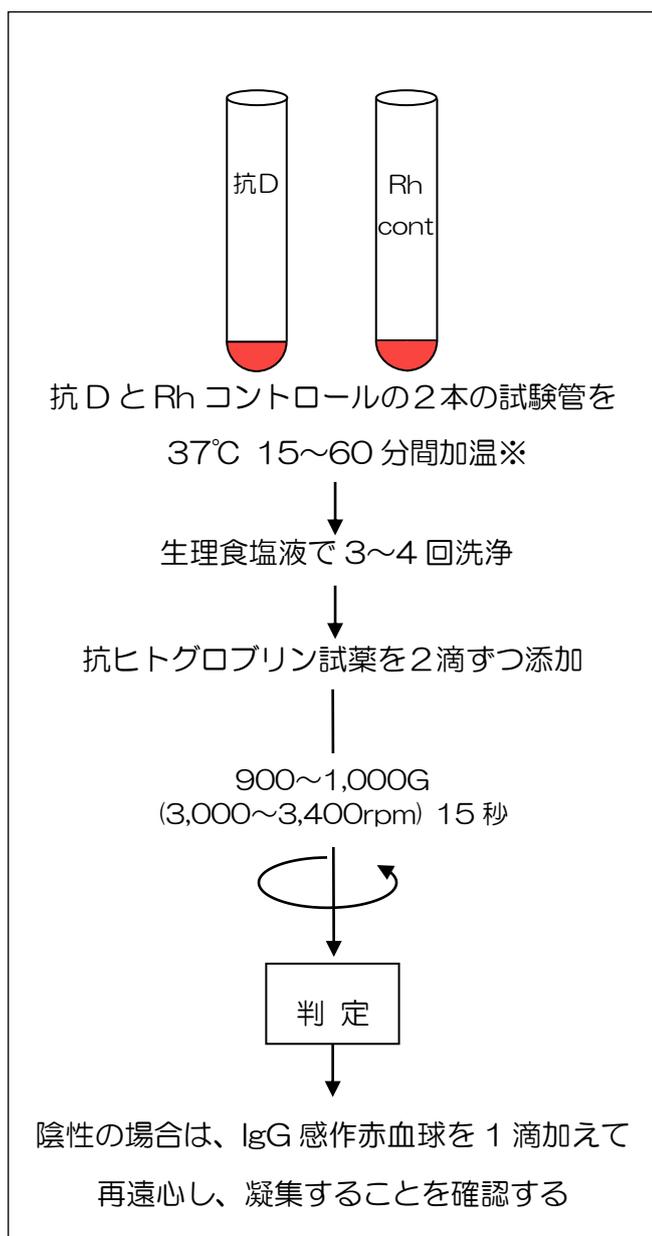
オモテ・ウラ不一致の場合

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

【D 陰性確認試験】

《指導のポイント》

- ☞ D 陰性確認試験を行う理由を考える。
- ☞ 抗 D 試薬の種類・特性や使用方法について考える。
- ☞ Rh コントロールの意義について考える。
- ☞ 判定上の注意点、確認すべき点について考える。
- ☞ 反応態度に基づいた判定結果について考える。



※反応時間については、試薬の添付文書に従う

D 陰性確認試験

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	検査の意義	D 陰性確認試験を行う理由を理解しているか？	抗 D 試薬の直後判定で陰性を示した検体について、D 陰性または weak D であることを確定するため (TM-p4、参照)。
方法・原理の理解度	抗 D 試薬について	使用している抗 D 試薬の種類・特性や方法を理解しているか？	IgM 型の抗 D 試薬は D 陰性確認試験には使用できない。
	Rh コントロールの意義について	Rh コントロールの判定が陽性となった場合について	D 陰性確認試験は Rh コントロールの判定が陰性の場合のみ判定できる。 Rh コントロールの判定が陽性となった場合は判定保留とし、その原因を精査する。 『Rh コントロール陽性への対応』(TM-p16、参照)。
	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？	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応	IgG 感作赤血球を使用しているか？	IgG 感作赤血球は、間接抗グロブリン試験の精度管理上、必要不可欠であり、洗浄操作や洗浄回数、抗ヒト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である。反応が陰性の場合、結果は無効であり、再検査をする必要がある。ただし、試薬の入れ忘れ、不適切な検体量・反応温度・反応時間などは確認できない。
		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？			
判定について	反応態度に基づき正しく解釈しているか？	反応態度より以下のように判定する。 1) 抗 D 試薬直後判定 (-)、D 陰性確認試験 (-) → D 陰性 2) 抗 D 試薬直後判定 (-)、D 陰性確認試験 (+) → weak D	

【不規則抗体スクリーニング】

《指導のポイント》

☞ 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。

☞ 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？

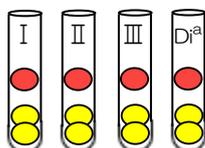
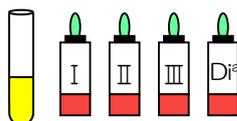
血漿（血清）のタンパク濃度や使用する反応増強剤によって、洗浄回数を増やす必要がある場合がある。その理由と確認方法を理解しておこう。

① 生理食塩液法

患者血漿（血清）2 滴

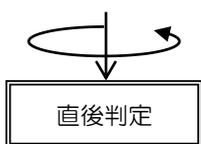
+

スクリーニング赤血球 1 滴



900~1,000G(3,000~3,400rpm)

15 秒



② PEG を用いた間接抗グロブリン試験

生理食塩液法の試験管に PEG 試薬 2 滴添加



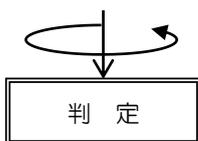
37°C/10~15 分間加温

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

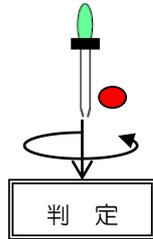
900~1,000G(3,000~3,400rpm)

15 秒



- ③ IgG 感作赤血球 1 滴添加
(ただし、陰性を呈した試験管のみ)

900~1,000G(3,000~3,400rpm)
15 秒



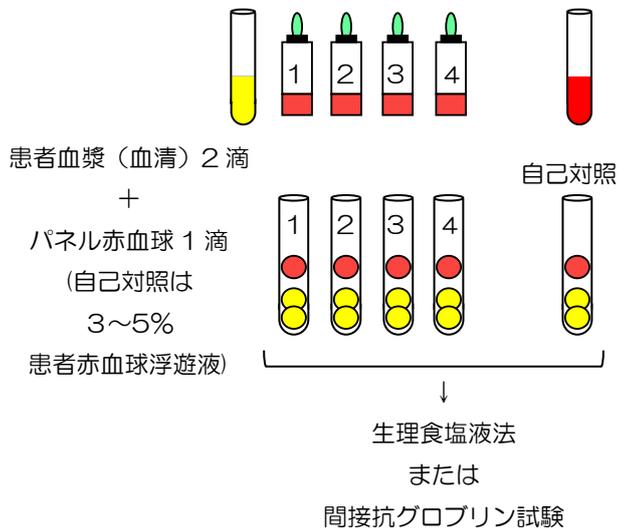
☞ IgG 感作赤血球の原理について、正しく理解しているか？また、陰性となった場合の原因と対処法について考える。

☞ 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】

《指導のポイント》

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



☞ 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？ スクリーニング検査に、Di(a+)赤血球も加えているか？	スクリーニング赤血球には、以下の抗原が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。 C, c, E, e, Jk ^a , Jk ^b , Fy ^a , Fy ^b , S, s 抗 Di ^a は溶血性輸血副作用や胎児・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	検体の取り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？	臨床的意義のある 37℃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-p9、参照)。 1) 感度は PEG-IAT>LISS-IAT>ALB-IAT(QA-p8-9、Q2.3.2 および Q2.3.7 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-p9、Q2.3.3 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。
		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？	
	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？	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。
反応増強剤の特性を理解し、洗浄回数を設定しているか？			
IgG 感作赤血球の意義と反応が陰性の場合の対応	IgG 感作赤血球を使用しているか？	IgG 感作赤血球は、間接抗グロブリン試験の精度管理上、必要不可欠であり、洗浄操作や洗浄回数、抗ヒト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である。反応が陰性の場合、結果は無効であり、再検査をする必要がある。ただし、血漿(血清)の入れ忘れ、不適切な検体量・反応増強剤添加量・反応温度・反応時間などは確認できない。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。	
	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？		

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である。
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？	<p>‘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。</p> <p>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る。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、除外できない抗体を絞り込み、抗体の特異性を確定する(TM-p15-16、参照)。</p>
		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いるか？	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ため、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增强されることがある。 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.Kidd 血液型に対する抗体、Rh 血液型に対する抗体等)。 	

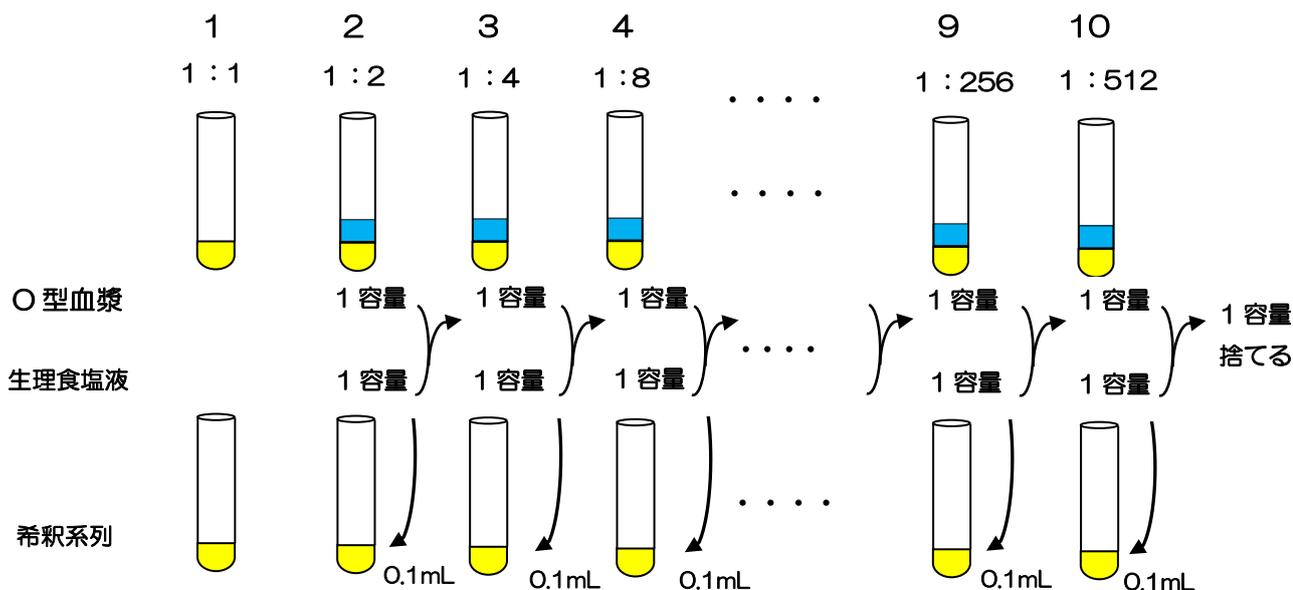
参考資料：試料作製例

【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) ・各強さの凝集反应用検体は、凝集が弱くなることを考慮し若干強めに調製する。
・作製した凝集反应用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、間接抗グロブリン試験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、A型にO型を入れる場合はO型赤血球を15%～20%の割合で混合する。O型にA型を入れる場合は、A型赤血球を10%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。)

《ウラ検査ですべ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試薬など）。
- 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、融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試薬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、血漿に種々の抗体試薬を混ぜれば簡便に作製できる。しかし、種々の抗体試薬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 血液型の抗体試薬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) 間接抗グロブリン試験により抗 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 試薬を使用した場合は RhD 陽性赤血球と RhD 陰性赤血球を組み合わせることによって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。

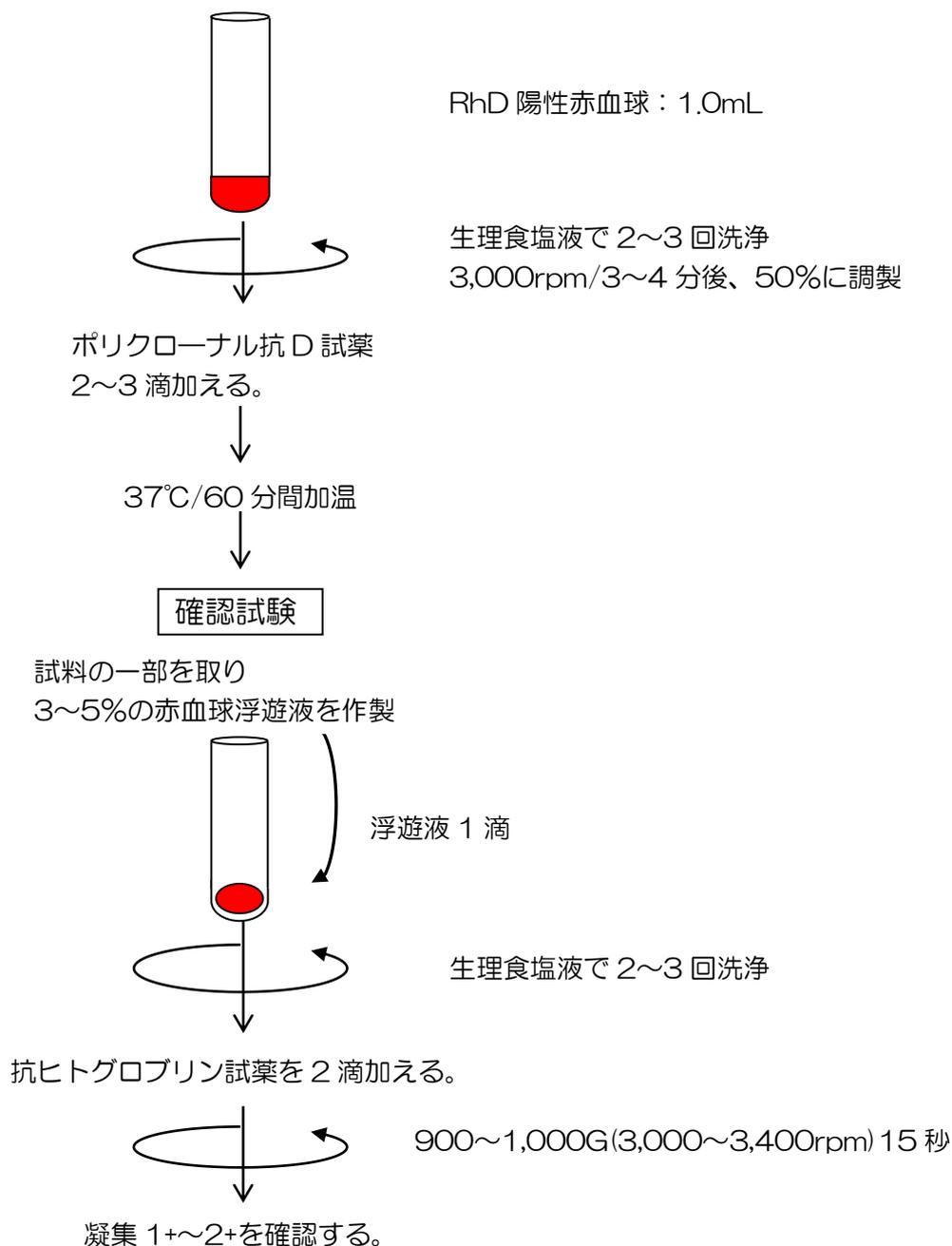
また、抗原組成表の (+) と (-) を置き換えることにより、否定できない抗体も自由に作製することができる。

※ 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。
 - 感作に使用する抗体試薬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。
(抗体試薬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2015 実行委員

輸血テクニカルセミナー2015 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
副委員長	田崎 哲典	東京慈恵会医科大学病院 輸血部
委員	高梨 美乃子	日本赤十字社血液事業本部
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	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 検査・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	本田 昌樹	青森市民病院 医療技術局 臨床検査部
委員	井手 大輔	近畿大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター
委員	板垣 浩行	東海大学医学部附属病院 臨床検査技術科 輸血室
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
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	三木 茂之	株式会社 イムコア 営業統括本部

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	三浦 邦彦	手稲溪仁会病院
関東甲信支部	委員	石川 伸介	信州大学医学部附属病院
首都圏支部	委員	三末 高央	船橋市立医療センター
中部圏支部	委員	梁瀬 博文	静岡県立静岡がんセンター
近畿支部	委員	海老田 ゆみえ	福井大学医学部附属病院
中四国支部	委員	土居 靖和	愛媛大学医学部附属病院
九州支部	委員	松本 玲子	長崎みなとメディカルセンター市民病院

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
委員	松本 祐之	名古屋大学医学部附属病院
委員	岡田 茂治	埼玉県立がんセンター
委員	森山 昌彦	都立駒込病院 輸血細胞治療科

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
委員	日高 陽子	東邦大学医療センター大森病院

本テキストは無断転写を禁じます。
2016年3月19日、20日