

凝集判定の目合わせ検体作製

および

スポイト適下量の検討



富山大学附属病院 検査・輸血細胞治療部

道野 淳子

実技を行う前に

◆ 事前に確認すべきこと

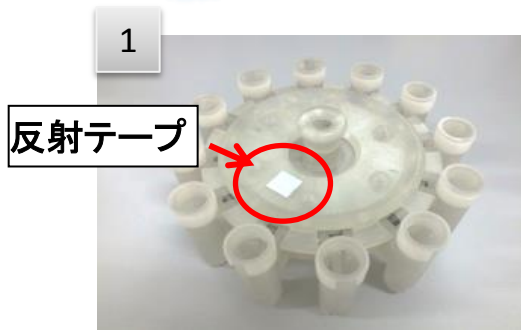
- **機器**の操作法および動作確認
- **試薬**が揃っているか、またそれらの使用量および有効期限を確認
- **器具類**が揃っているか、破損などはないか確認
- **サンプル**が適切な状態か確認

実技を行う前に

➤ 機器の操作法および動作確認

- 1) 判定用遠心機の管理
 - (1) 回転数（タコメーターを使用 *）
 - (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
- 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

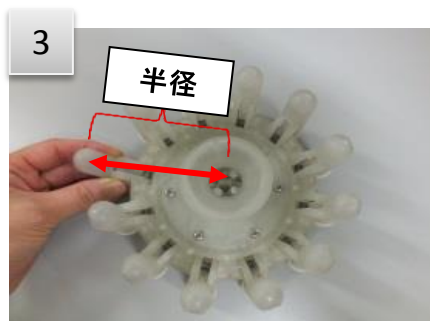
タコメーターを用いた回転数の測定



反射テープを確認
試験管6本を、対照
になるようセットする。



遠心機をスタートさせ、
MAXの回転数を記録する。



ローターの半径を測る。

4

←遠心力と回転半径、回転数の関係→

遠心半径 (cm)	遠心力 (g)	回転数 (rpm)
30	7000 ± 700,000	5000 ± 50,000
25	4000 ± 400,000	4000 ± 40,000
20	2000 ± 200,000	4000 ± 40,000
15	1000 ± 100,000	3500 ± 35,000
12	600 ± 60,000	3000 ± 30,000
10	400 ± 40,000	2500 ± 25,000
8	200 ± 20,000	2000 ± 20,000
7	150 ± 15,000	1500 ± 15,000
6	100 ± 10,000	1200 ± 12,000
5	50 ± 5,000	1100 ± 11,000
4	20 ± 2,000	1000 ± 10,000
3	10 ± 1,000	800 ± 8,000
2	5 ± 500	700 ± 7,000
1	2 ± 200	600 ± 6,000
0.5	1 ± 100	500 ± 5,000

遠心力は回転軸から遠心管底部までの回転半径と回転数に因り、次の式で決定する。

$$\text{遠心力 (g)} = 1.118 \times 10^{-5} \times \text{半径 (cm)} \times \text{回転数 (rpm)}^2$$

$$\text{回転数 (rpm)} = \left[\frac{\text{遠心力 (g)}}{1.118 \times \text{半径 (cm)}} \times 10^5 \right]^{1/2}$$

換算表より遠心力 (g) を換算する。

遠心力の求め方

$$RCF(\times g) = 11.18 \times (N / 1000)^2 \times R$$

RCF : 遠心力($\times g$) (RCF: relative centrifugal forceの略号)

R : ロータの半径(cm)

N : 毎分の回転数(rpm)

遠心力の算出方法

遠心力自動算出システム

求めたい値以外の2つの項目に、適正範囲内の数値を半角数字で入力し、計算ボタンをクリックしてください。()内がそれぞれの適正範囲です。
入力されていない項目に計算結果を算出します。

遠心力 $\times g$ (10~700,000)

ロータ半径 cm (3~30)

回転数 rpm (500~50,000)



$r \doteq 9\text{cm}$
3,100rpm



$r = 8\text{cm}$
3,400rpm

HS-12(コクサン)

実技を行う前に

➤ 試薬が揃っているか、またそれらの使用量、有効期限を確認

1) ABO血液型

- (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A₁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

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 (Di^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 ② 低イオン強度溶液の、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)

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

- (6) 3~5% IgG感作赤血球

- (7) 0.85~0.9%生理食塩液(または局方生理食塩液)

実技を行う前に

➤ 機具類が揃っているか、破損などはないか確認

- 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) 洗浄ビン : 500mL入り樹脂製のもの
- 5) 温度計 : 恒温槽の実温度を測定
- 6) タイマー

実技を行う前に

➤ サンプルが適切な状態か確認

- 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、乳ビ 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

凝集の目合わせ検体作製・スポイト滴下量の検討 目的

凝集の目合わせ検体作製

1. 抗体価を正しく測定するための基本を学ぼう。
 1. ピペットの使い方
 2. 希釈および判定の順序、方法
 3. 凝集判定の見方
2. 凝集判定の基準となるような強さを作製するための、希釈倍率の決め方を学ぼう。

抗体価の結果からの調製方法
3. 作製に使用する試料 (O型血漿 or 抗D or ..) について考えよう。
4. 凝集判定の目合わせ検体を用いた指導の意義を考えよう。
5. 血漿を滴下するときのスポイトの角度による量の違いを確認しよう。

スポイト
滴下量検討

凝集判定の目合わせ検体作製 - 全体の流れ -

使用試薬および試料、器具の確認

- マイクロピペットおよびチップ(100 μ L、200 μ L..)
- O型血漿(規則抗体) ・ 希釈用 生理食塩液 ・ 確認用3%赤血球浮遊液

操作手順

I. O型血漿を用いた希釈系列の作製



II. 抗体価の判定

標準検体と対比し判定



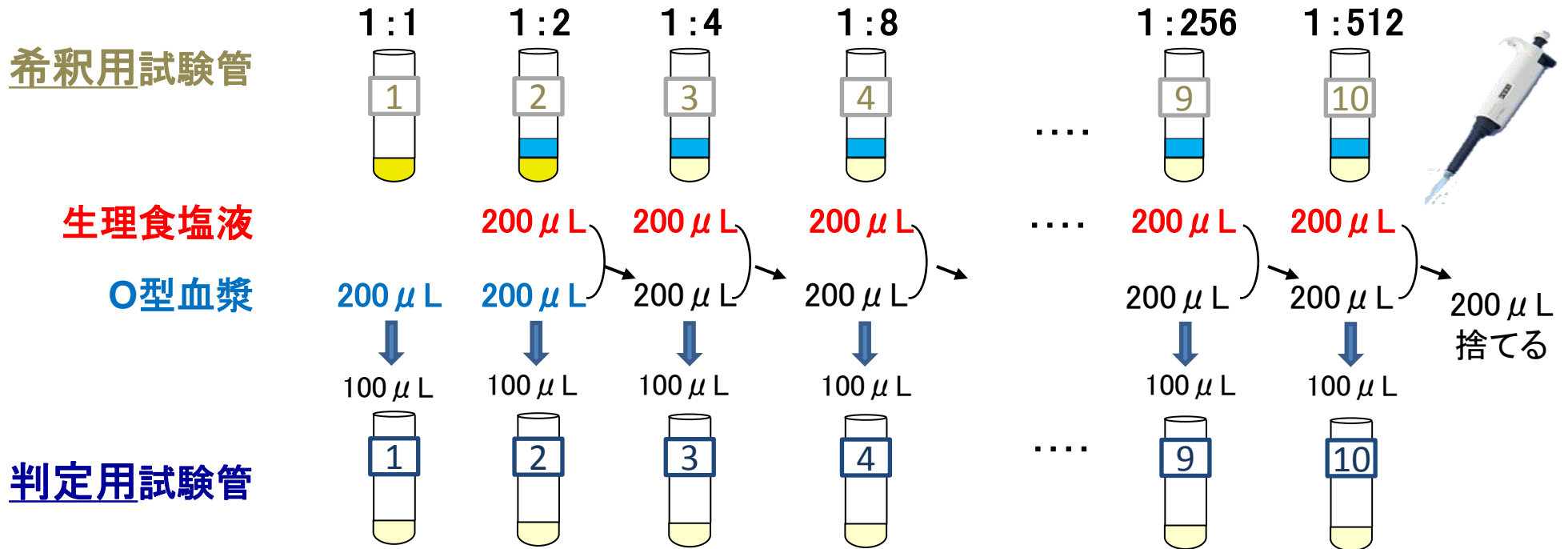
III. 抗体価をもとに 判定用検体(1+、2+、3+)を作製、判定確認



IV. 別グループが作製した検体を 凝集判定

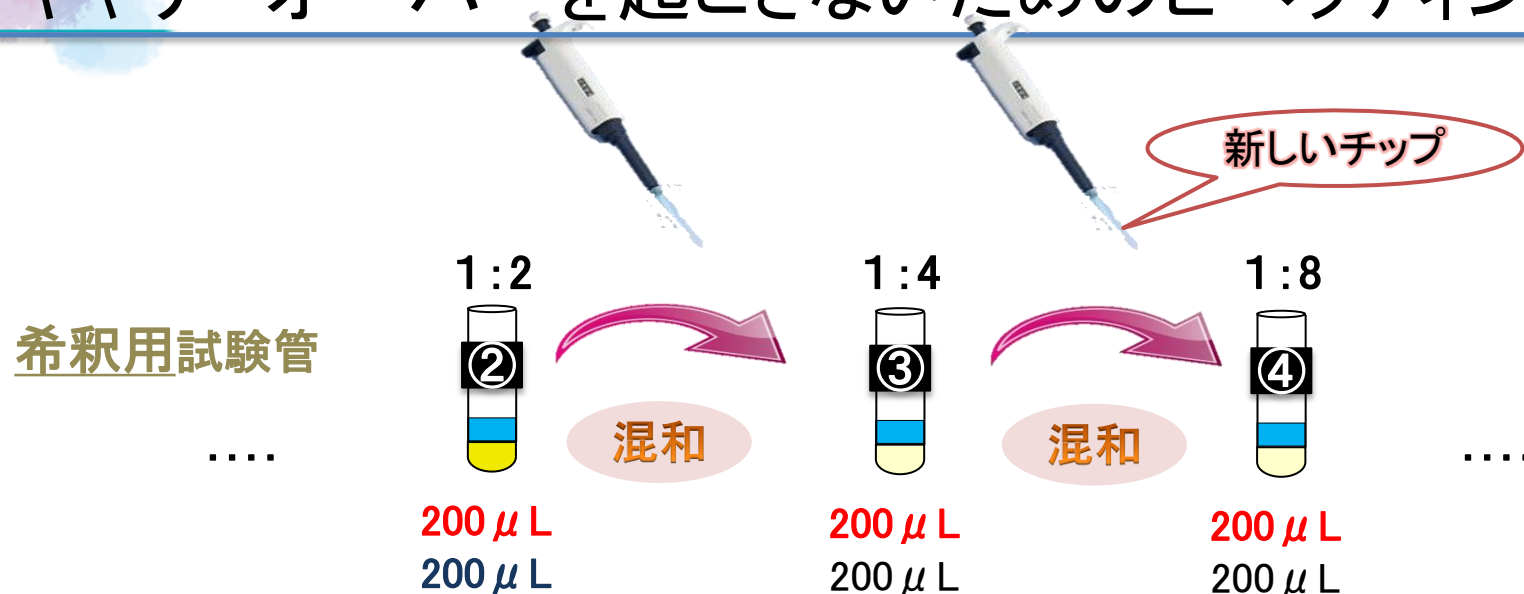
凝集判定のための反応時間(10分)を利用して、**スポットの検討**を行う

手順 I . O型血漿を用いた希釈系列の作製 (各自)



1. 希釈用と判定用の試験管を10本ずつ立て、それぞれ1~10のナンバーをふる。
2. 希釈用の 2~10の試験管に、生理食塩液を200 μ L ずつ分注する。
3. 希釈用 1 および 2 の試験管に、O型血漿を200 μ L ずつ分注する。
4. 希釈用試験管 2から順に倍々希釈を行う。10の試験管を希釈後、200 μ Lを捨てる。
5. そのチップを用いて、希釈した血漿を、判定用試験管に10から、順に100 μ L ずつ分注する。

キャリーオーバーを起こさないためのピペッティング操作

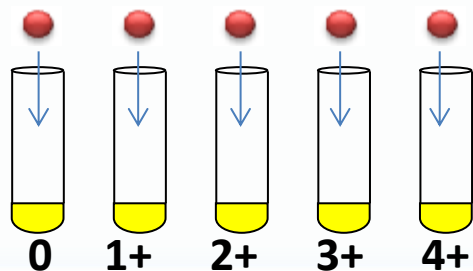


- ②の試験管をよく振って混和する。
- ②の試験管からピペットを用いて200 μ Lを採取し、③の試験管に吐き出す。
- ③の試験管をよく振って混和する(チップを用いてのピペッティングはしない)。
- 新しいチップを用いて、③の試験管から200 μ Lを採取し、④の試験管に吐き出す。

☆ 実技講習会では、チップの数に限りがあるため、交換せず使用する。
但し、溶液を吸う時は、チップの先端を利用し、キャリーオーバーの影響を受けないよう気を付ける。

手順Ⅱ. 標準検体の判定および抗体価の判定(各自)

① 標準検体



1. 試験管を5本準備 用意する。
2. 試験管に、該当する試料(血漿)を、スポイトで2滴ずつ滴下する。
3. 確認用3%赤血球浮遊液を判定用試験管に1滴ずつ滴下する。

② 抗体価測定

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



抗体価は希釈倍数の
高い方から判定する。

確認用3%赤血球浮遊液を判定用試験管に 1滴ずつ滴下する。

- ①および②は、軽く攪拌し室温に10分静置後 900~1,000G(3,000~3,400rpm)遠心する。
- ①の標準検体の判定を行う。
- ②の抗体価は、凝集の取り過ぎ防止のため、希釈倍数の高い方から判定する。

手順Ⅱ.

目合わせ検体の凝集判定を行う時のポイント！

- 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。
- 遠心後、試験管を静かに取り出し、1本ずつ判定する。
- 試験管を斜めにし、セルボタンを上に向け、管底を静かに傾け、赤血球が崩れていく様子を観察する。
- 判定は、すべての赤血球が管壁から剥がれた時点で行う。

手順Ⅲ. 抗体価をもとに判定用検体を作製(2名で)

No	1	2	3	4	5	6	7
希釈倍率	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
凝集の強さ	4+	4+	3+	2+	2+	1+	W+
	← 4+ →		3+	← 2+ →		1+	

左記の結果の場合(希釈例)

強さ	倍数	生食	O型血漿
3+	×4	<u>900</u> μL	<u>300</u> μL
2+	×10	<u>900</u> μL	<u>100</u> μL
1+	×30	<u>400</u> μL	<u>2+</u> を200 μL

凝集の強さが3+、2+、1+ となるよう希釈の割合を決定し、希釈検体を作製する。

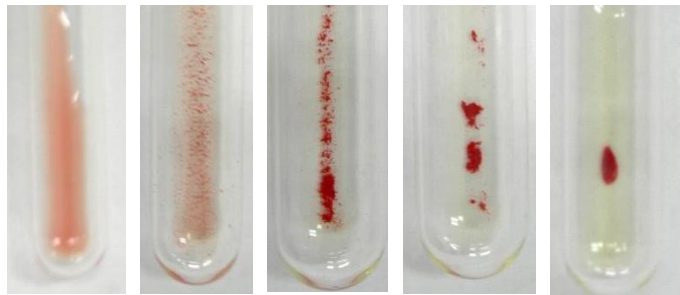
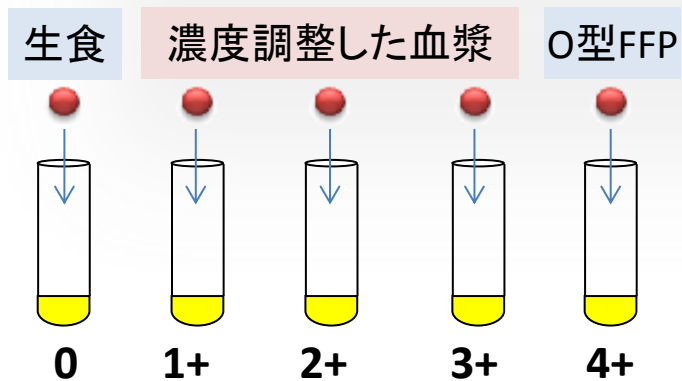
例) 上記の場合、O型血漿を**4倍希釈**(生理食塩液 900 μL + O血漿 300 μL)すれば **3+**の凝集、**10倍希釈**(生理食塩液 900 μL + O血漿 100 μL)すれば **2+**の凝集、**30倍希釈** (生理食塩液 400 μL + 10倍希釈のO血漿 200 μL)すれば **1+**の凝集が得られる。

※ 凝集が弱くなることを考慮し、若干強めに調整する。

※ 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。

手順Ⅲ. 作製した検体を確認(各自)

③ 作製検体



1. 試験管を5本 準備し、それぞれマーキングする。
2. 試験管に、該当する試料(血漿)を、スポイトで2滴ずつ滴下する。
3. 確認用3%赤血球浮遊液を判定用試験管に1滴ずつ滴下する。
4. 軽く攪拌し、室温に10分静置後 900～1,000G(3,000～3,400rpm)遠心し、凝集判定を行う。

手順Ⅳ. A～Eの検体作製(2名で)

生理食塩液



濃度調整した血漿



O型 FFP



A～Eのラベルの付いた試験管をランダムに並べる。

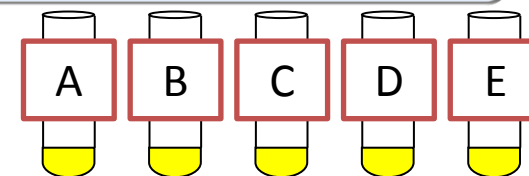
それぞれ、500 μ L程度 (2名が検査できる充分量)、分注する。

1. A～E のラベルの付いた試験管をランダムに並べる。
2. 5種類の濃度の違う血漿 (生理食塩液、1+、2+、3+、O型血漿)を、滴量ずつ (2名分:500 μ L程度)分注する。
3. 別のグループに、作製したA～Eの検体を渡す。

手順Ⅳ. 別グループが作製した検体の凝集判定(各自)

1. 別グループが作製したA～Eの検体を受け取り、凝集判定を、手順Ⅱの目合わせ検体の凝集判定を行う時のポイントに従い行う。
2. 記録用紙に、判定結果を記入する。
3. 判定結果について、ディスカッションする。

④ 別グループ作製検体



記録用紙

A	B	C	D	E
2+?	0	4+	1+?	3+?

凝集判定の目合わせ検体の目的 および 支部伝達講習会を行う際の注意事項

目的：凝集判定のばらつきを最小限に抑えるための、ポイントを学ぶ。

◇ 記録用紙1回目：各自思い通りの分注により、判定

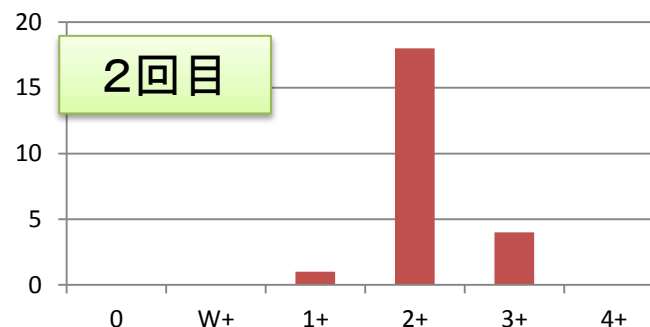
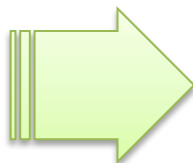
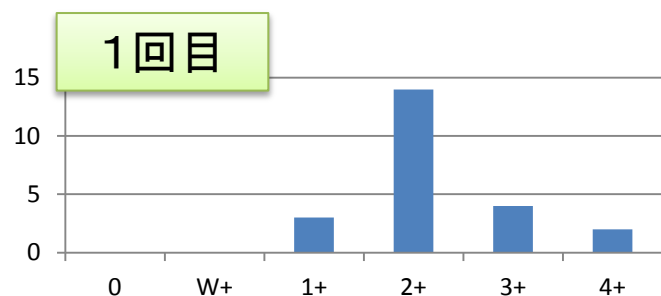
A	B	C	D	E
w+	4+	0	2+	2+

➡ 1回目回収

◇ 記録用紙2回目：目合わせ検体の凝集判定を行う時のポイントを守り、判定

A	B	C	D	E
2+	0	4+	1+	3+

➡ 2回目回収



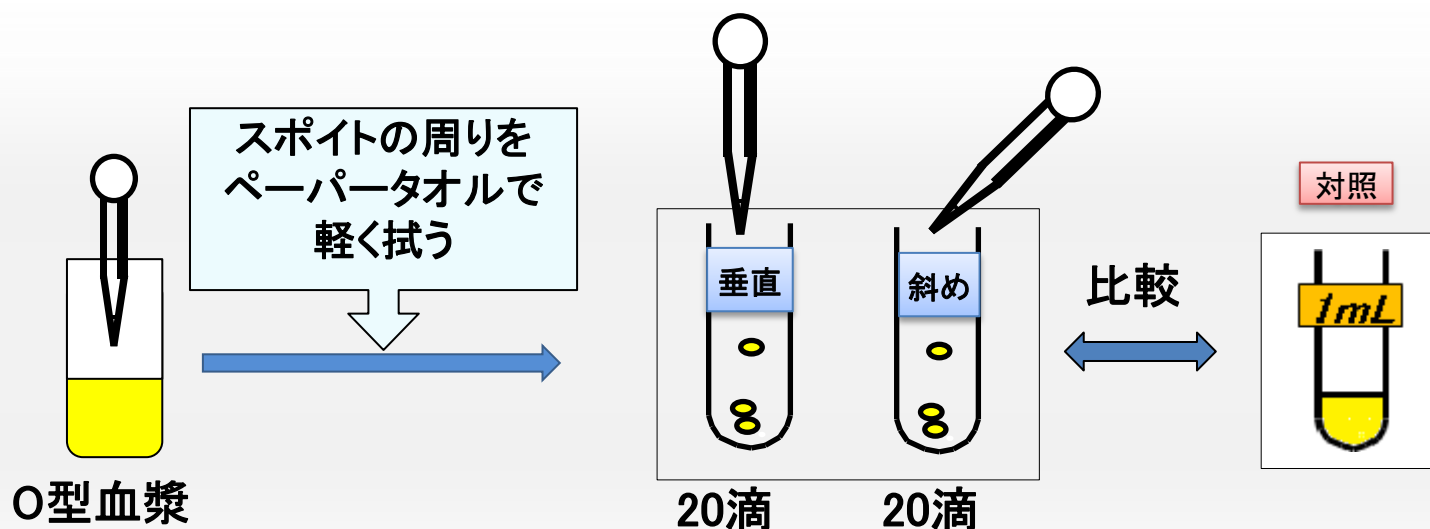
反応時間など空いている時間を利用して

血漿を滴下するときのスポイトの角度による量の違いを確認しよう

使用機材および試料:

- 樹脂製スポイト
- O型血漿(目合わせ検体作製時に使用した血漿)
- 試験管 3本 ① 垂直
② 斜め
③ 対照(1mLの O型血漿がすでに入っている)

方法



「垂直」および「斜め」の試験管は、比較後スタッフが回収

滴下量に差ができる要因

- 液体分子の種類(表面張力)、温度
- スポイト素材の違い(疎水性・親水性)
- 傾斜
- 滴下速度

スポイトの傾斜が滴下量に及ぼす影響

垂直

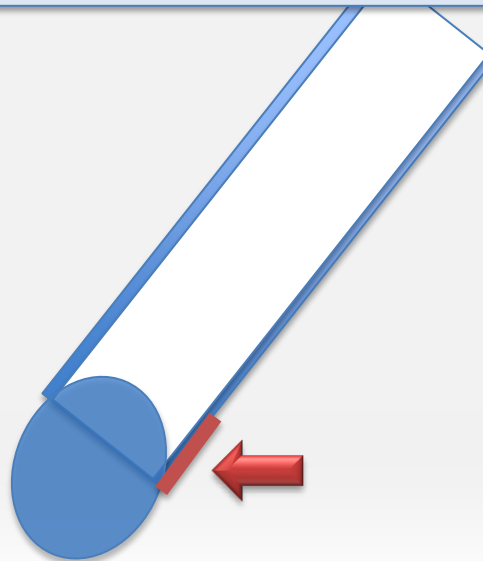
先端の円周で均等に力がかかる。



斜め

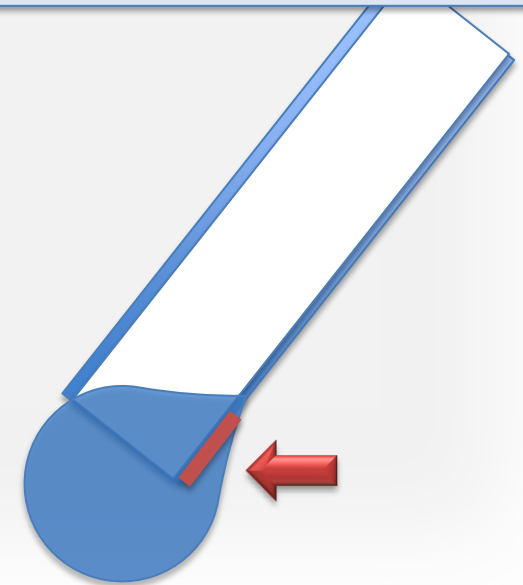
疎水性(≒撥水性)

液体は、管壁にはじかれ、不均一に力がかかることで、滴下量が減る。



親水性

液体は、管壁を伝うことで接触面積が増え、滴下量は増える。

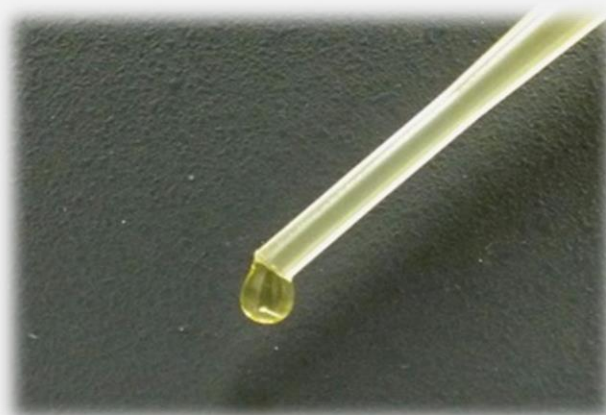
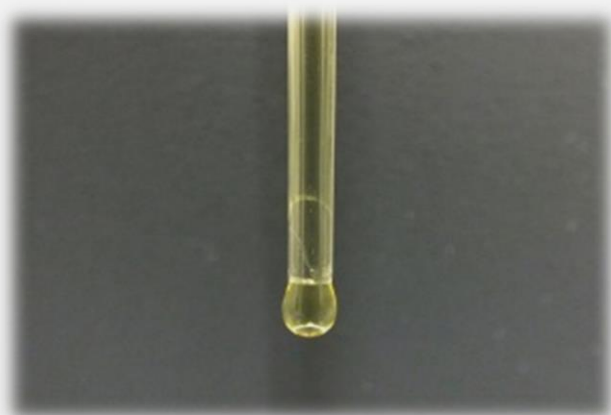


スポイトの傾斜が滴下量に及ぼす影響

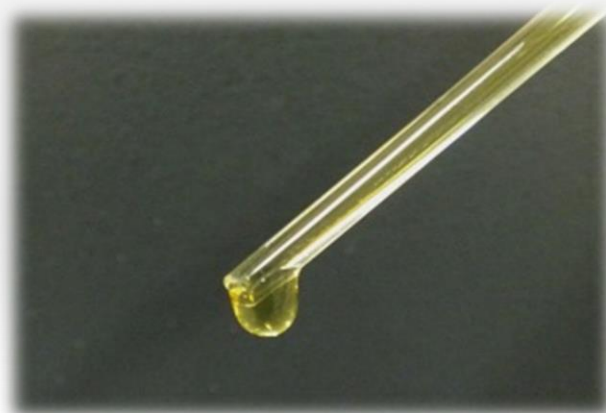
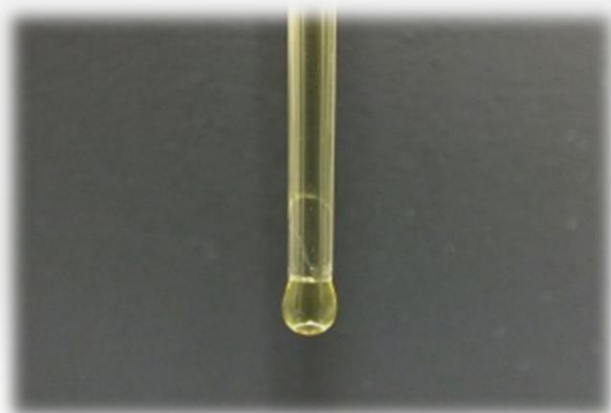
垂直

斜め

樹脂製



ガラス製



まずは、必要な試薬や器材を確認しましょう

	凝集判定用	スポイト検定用
2名で1つ	<ul style="list-style-type: none">• O型血漿• 3%A₁赤血球（凝集価および強さ確認用）	1mL血漿の入った試験管（スポイト適下量確認用）
1人ずつ	<ul style="list-style-type: none">• マイクロピペット・チップ（100 200μL）（持参）• ラベルされた空の試験管 A、B、C、D、E	ラベルされた空の試験管 <ul style="list-style-type: none">• 垂直• 斜め
その他	スポイト、試験管、ペーパータオル、記録用紙、卓上遠心機 恒温槽、廃液および廃棄用容器	

それでは、始めてください！