

輸血細胞治療における遺伝子検査の導入について

舞木 弘幸

鹿児島大学病院 輸血・細胞治療部

当院輸血・細胞治療部にて行ってきた遺伝子検査の導入の経緯と現状について報告する。

1. ABO, RHD/RHCE 遺伝子解析による血液型の確定
ABO 亜型の Ax 型, Cis AB 型, 抗 B 抗体欠損 O 型, A 型モザイク, 高力価自己抗体による判定不能症例に対して ABO 遺伝子解析を行ってきた。ABO 遺伝子解析が有用である血液型に Cis AB 型がある。Cis AB 型は、「O 型と AB 型は親子にはなりえない」を覆した血液型であり、家系調査にて証明する必要がある。しかし、Cis AB 型に特異的なアリルが報告され現在では ABO 遺伝子タイピングにて Cis AB 型を確定することが可能である。Cis AB 遺伝子は、A 遺伝子の Exon7 の 803 番目の塩基 G が B 遺伝子に特異的な塩基 C に、アミノ酸も Gly から Ala に置換しており、Cis AB 遺伝子は、A 遺伝子と B 遺伝子のキメラ構造を呈している。我々は、大阪府赤十字血液センターの福森康雄らが報告した AS-PCR, PCR-RFLP による Exon6 と Exon7 の解析にて塩基 803 番目の G>C 置換を確認し Cis AB 型を証明している。現在では、HLA の遺伝子タイピングにて導入した Luminex システムと ABO 遺伝子タイピングキット「ジェノサーチ ABO」を用いて ABO 遺伝子解析を行っている。「ジェノサーチ ABO」は、PCR-rSSO にて測定し Cis AB 型を含む各種 A, B 亜型の判定が可能である。一方、臨床面では RhD 不適合同種骨髄移植後、血清学的に RhD 抗原陽性の血球の検出が遅延した症例に対して Multiplex PCR を用いた RHD/RHCE 遺伝子解析を行い RHD 遺伝子を検出して生着を確認している。

2. DNA 多型解析を用いた同種造血幹細胞移植後のキメリズム解析

ABO 不適合同種造血幹細胞移植症例では、移植後血液型が Donor タイプへ変換することから、1992 年より ABO 不適合移植症例に対しては FCM による A, B 抗原の測定を行い赤血球キメリズムを定量化してきた。しかし、

ABO 不適合骨髄移植を行った J-CML の症例にて移植後白血球数は回復しているにもかかわらず Donor タイプの血液型抗原が検出されなかった症例を経験した。

HLA-DRB1 が Recipient と Donor が不一致を呈していたことから DRB1 をタイピングしたところ Recipient タイプのままであり生着不全を呈していた。この症例をきっかけに移植後の生着確認には他の検査方法が必要と考えた。1997 年、法医学領域にて DNA 鑑定に用いられていた VNTR 解析による同種骨髄移植後のキメリズム解析が金沢大学病院および兵庫医科大学病院から報告されていたことから兵庫医科大学病院輸血部の国分寺晃氏（現広島国際大学教授）の指導を受け導入を検討した。VNTR 解析の測定方法は、PCR 産物をポリアクリルアミドゲルを用いたミニゲルにて泳動後、SYBR green I にて染色しバンドを検出した。尚、VNTR 解析は、当時輸血副作用で問題視されていた輸血後 GVHD の確定診断にも取り入れた。輸血後 GVHD の診断には、輸血前の患者血液もしくは患者の体細胞からの DNA の抽出が必要であり、患者の爪からの DNA の抽出には DNA 抽出キット「スマイテスト EX-R&D」にて行った。この方法は現在でも移植前の患者の DNA の抽出がされていない症例もしくは他施設にて移植を行った後、当院で経過観察をする場合などに Recipient の爪からの DNA 抽出に用いている。その後、血縁者間の移植では Recipient と Donor の VNTR が一致する症例が散見されたことから VNTR から STR に変更した。当初は、3 ローカスを同時に増幅する Multiplex PCR にて増幅しロングゲルにて泳動後、銀染色にてバンドを検出した。しかし、キメリズムの定量が必要となり DNA シークエンサーを用いた STR 解析を取り入れることにした。蛍光 primer にて PCR を行い DNA シークエンサーにて泳動後、専用のソフトウェアを用い混合キメラを呈したアリルの Peak Area からキメリズムを定量化した。今後、キメリズム解析には高感度の検出が可能である Real time PCR の導入も必要と考えられた。

輸血部門の造血幹細胞移植医療への支援体制について

竹ノ内 博之

(宮崎大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部)

チーム医療という言葉が広く聞かれるようになり、ここ最近、日本臨床検査技師会も事業として積極的に取り組んでいる。今回テーマとしていただいた広い意味での「細胞治療・再生医療」に関する最近のトピックとして、昨年 iPS 細胞が国内で初めて臨床応用され、平成 25 年 11 月に「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(再生医療等安全性確保法)と「薬事法等の一部を改正する法律(医薬品医療機器等法)」(薬事法改正法)が成立、施行された。また、平成 26 年 1 月には「移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に関する法律」が施行されるなど再生医療・細胞(治療)製品についての法制度の枠組み作りが進んでいる。人材育成の面でも、日本輸血・細胞治療学会と日本造血細胞移植学会が合同で細胞治療認定管理師制度を本年 4 月に発足した。このような背景から、輸血部門に従事する臨床検査技師の業務として、今後この分野での活躍が増えていくことが予想される。

造血幹細胞移植医療は、国内でも約 50 年前から行われており、骨髄移植(Bone Marrow Transplantation; BMT)、末梢血幹細胞移植(Peripheral Blood Stem-Cell Transplantation; pBSCT)、臍帯血移植(Cord Blood Transplantation; CBT)と大きく 3 つに分かれる。BMT と pBSCT については、自家移植(Auto-)と同種移植(Allogenic-)に分けられるため、細胞源としては 5 種類となる。近年では、対象年齢の引き上げや臍帯血、末梢血幹細胞など造血幹細胞源の多様化、HLA 検査技術や移植前治療薬、GVHD 予防薬、抗菌剤等の医療技術の進歩に伴う移植成績の向上、高齢者人口増加に伴う疾患患者の増加などを背景に移植件数は年々増加している。その反面、地方での血液内科医の不足もあり、臨床検査技師の診療支援に対する期待値は、今後ますます増えるものと思われる。

造血幹細胞移植に関連して輸血部門で行う業務は、大きく 3 つに分けられる。第一に通常の輸血検査および製

剤管理業務である。幹細胞移植の対象患者は、原疾患および頻回の化学療法等による骨髄抑制のため、輸血による支持療法が必須となる。その為、入院時から血液型検査や不規則抗体スクリーニング等の輸血検査を行い、適宜輸血用血液製剤の準備と交差適合試験、場合によっては輸血前後の感染症検査などを行う。第二に、移植に関連した特殊検査業務がある。これについては施設の規模や移植件数等で、院内で実施できる検査項目に違いがあるが、移植ドナー/レシピエントの HLA タイピング、HLA 抗体検査や抗血小板抗体検査、CD34 陽性細胞の測定、キメリズム解析などが挙げられる。最後に幹細胞採取・移植に関連した特殊業務がある。

これら輸血部門の造血幹細胞移植医療への支援体制について、本院での取り組みと臨床検査技師が担っている役割分担を中心に紹介していきたい。

【連絡先】 TEL : 0985-85-9723

e-mail : hitake@med.miyazaki-u.ac.jp

演題名 臓器移植における臨床検査技師のかかわり

氏名 山口 恭子
(施設名) 九州大学病院検査部

【はじめに】

臓器移植は、医師、看護師はもちろんのこと、移植コーディネーターや薬剤師、管理栄養士、診療放射線技師、臨床検査技師などのコメディカルスタッフによるチーム医療である。ABO 血液型不適合移植や脳死下での臓器提供が増加している今日、臨床検査技師の役割も重要になっている。臓器移植における臨床検査技師の関わりについて、九州大学病院における輸血対応を中心に話をする。

【九州大学病院での臓器移植件数】

臓器移植では様々な臓器が対象となるが、提供者が生体であるか死体（心臓停止下、脳死下）であるかによって提供できる臓器が異なる。当院における 2014 年の主な臓器移植件数は心臓 2 件、肝臓（生体 50 件、脳死 3 件）、腎移植（生体 82 件、献腎 10 件）であり、ABO 式血液型不適合移植は生体肝移植で 10 件（20%）、生体腎移植では 25 件（30%）であった。

【臓器移植と検査技師の関わり】

臓器移植における臨床検査技師の関わりは、検査と輸血製剤の準備が主であるが、自施設で脳死下臓器提供者が現れれば、脳死判定にも携わることとなる。また、臨床検査技師は日本臓器移植ネットワークが公募している移植コーディネーターの応募資格があり、移植コーディネーターとして臓器移植に関わることも可能である。

輸血における移植前検査には HLA 検査や血液型検査、不規則抗体検査がある。また、近年 ABO 式血液型不適合移植が増加しており、移植前後の抗 A 抗 B 抗体価検査の件数も増えている。抗体価が高値の場合は、抗体価を下げる目的で血漿交換も行われており、大量の FFP やアルブミン製剤の準備が必要である。ABO 式血液型不適合移植では、使用する血液型が本来の血液型と異なるため、間違いを起こさないためのシステム整備も輸血に携わる臨床検査技師の重要な業務である。

【臓器移植時の輸血に関する問題点と対応】

脳死下臓器移植では移植決定から手術までの準備期間が短く、血液製剤の確保や不規則抗体陽性時の対応に苦慮することがある。また、生体肝移植のように長時間にわたる手術はもとより、脳死下臓器移植は時間外にも手術を行う事が多く、不慣れな検査技師が輸血対応をする場合がある。当院では、2013 年に行った脳死下臓器移植のうち、7 割が時間外に実施された。そのため、日頃から時間外担当者への教育を行うこと、移植開始前に出来る限り準備を行うこと、不測の事態に対応できるよう輸血専用技師との連絡体制を整えることなどが重要である。

【まとめ】

2010 年 7 月に「改正臓器移植法」が施行されてから丸 5 年が過ぎた。本人の意思が不明な場合でも家族の承諾で提供が可能となったことで脳死下での臓器提供が大幅に増加し、年間 40～50 例ほどになっている。しかし、日本における臓器移植は諸外国と比較し非常に少ない現状であり、今後増えていくことが予想される。したがって、献血者が減少している今日、血液を大量に使用する臓器移植に対し、いかに過不足なく血液製剤を確保し、スムーズに提供できるかが課題であり、輸血に携わる臨床検査技師の業務として、日頃から移植コーディネーターや移植に携わる医師などから情報収集を行い、前以って日本赤十字血液センターと情報共有することも重要である。

【連絡先】 TEL : 092-642-5866 (直通)

e-mail : kyvama@med.kyushu-u.ac.jp

演題名 洗浄血小板製剤による輸血副作用の回避

氏名 古賀 嘉人
長崎大学病院 細胞療法部

抄録本文

▽ 25 文字

【はじめに】濃厚血小板製剤輸血（以下、PC）に伴い、時に血圧低下や重症アレルギー反応などの非溶血性輸血副作用を発症することがあり主な要因は製剤中のドナー血漿成分や可溶性成分によるアレルギー反応と言われている。日本赤十字社の 2013 年の統計によると、非溶血性輸血副作用は血小板製剤によるものが最も多く全体の 37%を占める。それらを回避する目的で PC からドナー血漿を洗浄・除去した洗浄血小板製剤（以下、WPC）が有効といわれている。

WPC 使用にあたっては、血液センターと技術協力契約を締結し供給を受ける方法と、自施設で調製する方法がある。当院では 2013 年 12 月より輸血管理部門で WPC 調製を開始した。

【調製】日本輸血・細胞治療学会では 2008 年に「置換・洗浄血小板の適応およびその調整の指針」が策定された。当院も指針に沿って WPC の運用を行っている。WPC は院内調製製剤であるため、使用するにあたっては、

- ① 倫理委員会の承認
- ② WPC 専用の同意書の取得
- ③ 2 日以上前に申し込み、依頼書提出

を要件としている。

調製には、血液バッグ用冷却遠心機、クリーンベンチ、バッグ同士のチューブを繋ぐ無菌接合装置（SCD）、チューブシーラー、分離スタンドが必要である。

作成方法は Oikawa らの方法に従い、重炭酸リンゲル液（ピカネイト輸液：大塚製薬）と ACD-A 液を使った方法で作製している。院内で入手しやすく、他法と比較し調整手技が簡便である。また、重炭酸を含むことにより洗浄翌日まで使用可能であり、作成時間の調整を柔軟に組むことができる。

▽ 25 文字

作成した WPC は、血小板回収率などにより適正に調製できているかを評価する。

輸血後は、副作用の有無の確認や補正血小板増加数

（CCI）、臨床症状の改善を確認し、調製した WPC の投与効果を評価することも必要である。

【実績】WPC への切り替えの理由は多くは非溶血性輸血副作用の回避が目的であった。1 例、緊急時に同型 PC が入手できず、異型 PC を洗浄して使用した例があった。いずれも WPC 輸血では、副作用はゼロである。CCI については WPC 輸血翌日に血算が測定されておらず、CCI を求めることができないことが多くある。輸血効果確認について臨床の協力を求めている。CCI が計算できた症例では概ね輸血効果ありの判定であった。

【結語】WPC は、PC 輸血に伴う非溶血性輸血副作用の回避に有効であり、安全で効果的な輸血に寄与するものである。

【連絡先】 TEL : 095-819-7455

e-mail : yoshitsu@nagasaki-u.ac.jp

クリオプレシピテート製剤の作成と止血効果

立川 良昭

(大分大学医学部附属病院 輸血部)

【はじめに】

大量出血では消費性凝固障害と希釈性凝固障害の双方により凝固因子の枯渇を来すため、循環血液量を超える出血においては循環血液量の維持と赤血球輸血のみでなく、凝固障害への対応が重要となる。米国のガイドラインでは、アクティブな出血を認め、PTもしくはAPTTが正常平均の1.5倍を超える場合、15mL/kgのFFPの投与を行うべきとされている。また、フィブリノーゲン値(Fib)が80~100mg/dLの場合には、10単位のクリオプレシピテートを投与するとされているが、本邦ではクリオプレシピテートや濃縮フィブリノーゲン製剤を使用することができない。一方、FFPには正常レベルの凝固因子しか含まれておらず、FFPを用いて凝固系を改善させるためには、大量のFFPを輸血する必要がある。循環動態に与える影響は無視できなくなる。短時間にFibを止血可能域まで上昇させ大量出血等により凝固障害を来した患者の止血を目的として、クリオプレシピテート製剤の院内調整を開始した。

【調整方法】

既報に準じ、AB型FFP-LR480を①4℃の保冷庫にて約30時間かけて解凍後、②再び-20℃冷凍庫にて凍結、③再度4℃の保冷庫にて約30時間解凍した後、④冷却遠心機(4℃)にて3,500rpm、40分遠心後、上澄を430mL除去し、沈殿物約50mLを1バッグとして保存する(2回解凍処理)。製剤の不足により、2回解凍処理を行う時間が確保できない場合は、②、③を省略し、作成する(1回解凍処理)。

【投与基準】

凝固因子低下を来したか、凝固因子低下が切迫する循環血液量の50%を超える出血を来したと考えられる大量出血症例、出血傾向を来しFibが150mg/dL以下に

低下している症例を対象とし成人に対し3バッグ(12単位分に相当)を基本とし投与を行った。

【結果】

院内調整を開始した2014年10月から2015年7月の期間に投与の行われた患者は51名であり、男性26名、女性25名、平均年齢69.5歳(25~91歳)であった。

診療科別では心臓血管外科39例(76.5%)、高度救命救急センター7例(13.7%)産科・婦人科2例(3.9%)、その他3例(5.9%)であった。

疾患別では、胸腹部大動脈破裂や急性大動脈解離、弁置換等の心疾患38例、交通外傷5例と使用例が多く認められた。

クリオプレシピテート製剤投与前のFibの平均は、148.6mg/dL(最大:434、最小:29)、投与後Fibの平均は、226.2mg/dL(最大:482、最小:86)であった。

前述の調整方法にて作成した12バッグについて調整前後のFibをトロンビン時間法にて測定すると調整前の平均値は、241.3mg/dL(最大:370、最小:150)、調整後の平均値は1049.4mg/dL(最大:1808、最小:422)であった。

【考察】

クリオプレシピテート製剤の投与は低Fib血症の速やかな改善に極めて有効であった。提供開始から要請が急増しており、現場で大量出血患者に対する有用性が実感されていると思われる。しかし、調整したクリオプレシピテート製剤個々のFib濃度に大きな差が認められた。今後、クリオプレシピテート製剤やフィブリノーゲン濃縮製剤の十分な供給体制が整備されることを期待する。

【連絡先】 TEL : 097-586-6057

e-mail : ytatsuka@oita-u.ac.jp

演題名 『自己血輸血療法における臨床検査技師の役割』

氏名 東谷 孝徳

(施設名) 佐賀大学医学部附属病院 検査部

患者中心の輸血医療 (Patient Blood Management) が注目される現在、同種血輸血で問題となる免疫学的副作用や輸血後感染症を防止できる自己血輸血は、将来妊娠の可能性のある女性や稀な抗体、また複数抗体を保有する患者に対し最も有力な輸血療法である。しかしながら、細菌汚染の危険性や血液製剤の取り間違えなどの問題もあり、適正な管理体制が必要である。自己血輸血の種類としては「貯血式自己血輸血」、「希釈式自己血輸血」、「回収式自己血輸血」があるが、輸血部門、とりわけ臨床検査技師は、「貯血式自己血輸血」への関与が大きい。

貯血式自己血輸血での保存法には、全血冷蔵保存、MAP 赤血球・FFP 保存、冷凍赤血球・FFP 保存などがあり、各施設に応じた保存法を用いる。全血保存は簡便で経費的にも有利であるが、凝固塊や寒冷凝集素による返血時のトラブルは発生しやすい。その点、各成分に分離して保存する場合は、その問題を軽減できる。また、FFP からは自己クリオプレシピテートも作成できる。

自己血は自己血専用の保冷库に保存するが、感染症陽性の自己血は、さらに別の保冷库を準備する。

自己血の取り違えは重大な問題を引き起こす。事務的なミスを防止するためにも患者情報、診療科、採血日、製剤の種類、有効期限、使用予定日などの情報を管理するコンピュータシステムの利用が望まれる。

自己血の出庫の際には、自己血の外観検査が重要である。血液の凝固等を見逃して返血時に気づくのでは対応が遅れる。出庫処理には自己血発注伝票と自己血の情報とを照合する。照合にはコンピュータシステムが有力である。自己血の交差適合試験は主試験を実施する。しかしながら、主試験では異型適合が見逃される危険性があるため、オモテ検査による ABO 血液型

の確認が望ましい。自己血の受払時には、患者情報と、診療科、採血日、製剤の種類、有効期限、数量等を二人以上で照合する。照合後には必ず氏名を発注伝票に記載する。未使用の自己血は感染性廃棄物として処理し、転用はしない。

その他、臨床検査技師の役割としては、自己血輸血推進のため、全般的な関与が求められる。自己血液の分離・保管のみならず、病棟等での輸血の実施、さらには輸血中・後の副作用の有無や輸血効果にまで注意しておく必要がある。同種血輸血の回避状況や採血や輸血におけるトラブル等についても記録し自己血輸血の効果や安全性について輸血療法委員会等を通じて院内に啓蒙する。今日では、認定制度が整備され、自己血輸血看護師や臨床輸血看護師などが活躍する施設が増えている。認定看護師等との共同で、より安全な自己血輸血の推進に努めることが必要である。

【連絡先】 TEL : 0952-34-3245
e-mail : sk2016@cc.saga-u.ac.jp