

5 自己溶血試験 (autohemolysis test)

先天性非球状赤血球溶血性貧血などで、自己溶血の亢進がみられるが、本法はそのスクリーニングに考案された方法である。先天性非球状赤血球溶血性貧血の中には、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PD) 欠乏症、ピルビン酸キナーゼ欠乏症など先天性の酵素異常 (欠乏) によって生ずるものが多く知られている。赤血球の解糖系に障害があるときは自己溶血が亢進し、グルコース添加でも補正されない (Dacie のⅡ型)。しかし、解糖系障害でも必ずしもⅡ型を呈するとはかぎらないことがわかり、赤血球内酵素測定や解糖中間体測定などが行われるようになったため、本法のふるいわけ試験としての価値は、従来より少なくなってきた。

原理 無菌的に採取した脱線維素血を、37℃に 24～48 時間静置したのちに自然に生ずる溶血度をみる。同時に、脱線維素血に一定濃度のグルコースを加えて静置し、その溶血度をみる。赤血球のエネルギー源はグルコースに依存するから、静置すると血中グルコースは低下し、24～48 時間静置後は正常赤血球でもある程度の溶血を起こすが、グルコース添加血ではその程度はわずかである。上記のような溶血性貧血で、解糖系の障害がある場合には溶血は亢進する。

試薬 ① 滅菌 10%グルコース生理食塩水溶液：グルコース 10 g を 0.85%塩化ナトリウム溶液に溶かし、全量 100 ml とし、滅菌しておく。

② 1%オルトトリジン溶液：オルトトリジン 1 g、酢酸 90 ml に精製水を加え、全量 100 ml とする。褐色瓶に入れ冷蔵庫保存 (2 週間ごとに新調)。

③ 1%過酸化水素液：3%過酸化水素 10 ml を精製水 20 ml に加え、褐色瓶に入れ冷蔵庫保存 (2 日ごとに新調)。

④ 10%酢酸：酢酸 10 ml に精製水を加え、全量 100 ml とする。

実施 ① 静脈血を採取して、無菌的に脱線維素血を作製する。

② 血液 1 ml ずつを 8 本の滅菌した 5 ml 用スクリュウキャップ付きの瓶にとる。そのうち、4 本には 10%グルコース生理食塩水溶液 0.1 ml ずつを添加し、両手できりをもむように瓶を回転して混和してする。

③ 各瓶を 37℃インキュベータ中に移し、グルコース添加および無添加の各 2 本ずつは 24 時間後、残りの各 2 本ずつは 48 時間後までインキュベートする (後者は 24 時間後に緩やかに内容を混和する)。

④ 別に、脱線維素血の一部と採血直後に分離した血清を冷蔵庫中に保存しておく。

⑤ インキュベート後の各 2 本ずつの試料を 1 つに合わせ、その一部でヘマトクリット (%) を測定し、残りを遠心して上清をとる。

⑥ 保存全血は 100 または 200 倍、保存血清と各上清は 25 または 50 倍に精製水で希釈する。

⑦ それぞれの希釈液 20 μl を 1%オルトトリジン溶液 1 ml の入った試験管に加えて混和し、さらに 1%過酸化水素液 1 ml を加えて、ただちに混和し 60 分間静置する。10%酢酸 10 ml ずつを加えて混和後、10 分間放置し波長 540 nm で、精製水を加えたものをブランクとして吸光度を測定する。

⑧ 次式により溶血度を計算する。

$$\text{溶血度}(\%) = (D_2 - D_3) \times \text{加温後血清の希釈倍数} / D_1 \times \text{全血の希釈倍数} \times (100 - \text{Ht})$$

D_1 ：希釈した全血の吸光度、 D_2 ：希釈した加温後上清の吸光度

D_3 ：希釈した加温前分離血清の吸光度、Ht：ヘマトクリット

基準範囲 (Dacie)

24 時間加温：無添加 0.05～0.5%，グルコース添加 0～0.4%

48 時間加温：無添加 0.2～2.0%，グルコース添加 0～0.9%

異常値 Selwyn-Dacie は、先天性非球状赤血球性溶血性貧血を自己溶血の形態から、Ⅰ型・Ⅱ型に分けた。Ⅰ型は、自己溶血度は正常ないし軽度亢進し、グルコース添加で軽減するもの (G-6-PD 欠乏症など)。Ⅱ型は、著しい溶血を呈し、グルコース添加によっても軽減しないものである (ピルビン酸キナーゼ欠乏症など)。遺伝性球状赤血球症では、溶血度亢進 (正常の 5～10 倍) をみるが、グルコース添加でかなりの程度まで軽減する。

測定上の変動要因 手技により基準範囲が多少異なるので、検者自身で基準範囲を求めておく必要がある。