

症 例

RhD 陰性血の赤血球輸血にもかかわらず
抗 D を産生した RhD 陰性の 1 例

佐久間志津枝¹⁾ 伊藤 佳代¹⁾ 鈴木 隆幸¹⁾ 安田 広康²⁾
大戸 齊²⁾ 室井 弥生³⁾ 平野 良紀³⁾ 金子 元久³⁾

¹⁾星総合病院検査科

²⁾福島医科大学医学部附属病院輸血・移植免疫部

³⁾福島県赤十字血液センター

(平成 17 年 3 月 8 日受付)

(平成 17 年 7 月 13 日受理)

PRODUCTION OF ANTI-D INDUCED BY RHD-NEGATIVE RED CELL TRANSFUSION
IN A RHD-NEGATIVE PATIENT

Shizue Sakuma¹⁾, Kayo Itou¹⁾, Takayuki Suzuki¹⁾, Hiroyasu Yasuda²⁾,
Hitoshi Ohto²⁾, Yayoi Muroi³⁾, Yoshinori Hirano³⁾ and Motohisa Kaneko³⁾

¹⁾Clinical Central Laboratory, Hoshi General Hospital

²⁾Division of Blood Transfusion and Transplantation Immunology,
School of Medicine, Fukushima Medical University

³⁾Japanese Red Cross Fukushima Blood Center

We experienced a case in which an anti-D antibody was developed after transfusion of RBCs from 19 apparently D-negative donors over a half-year period beginning in July 2000. The patient was 67-year-old, B-negative female with a history of sensitization by transfusion of D-positive RBCs. Antibody screening became positive and an anti-D was detected by indirect antiglobulin testing. However, no hemolytic episodes due to the anti-D were found in her clinical course. Specificity of the antibody was confirmed as an allo-anti-D by serological studies using differential absorption-elution or dithiothreitol-treated RBCs. We initially suspected the possibility of transfusion from D-positive or weak D donors and the Rh phenotypes of all 19 donors were back-checked. However, none was positive for D antigen by the indirect antiglobulin test and 5 donors included Ce haplotype. Genomic analysis to detect a D_{el} allele will demonstrate whether RBCs from a donor carrying a Del allele with Ce haplotype induced an allo-anti-D immune response.

Key words : RhD-negative, Del

はじめに

RhD は赤血球にのみに存在する抗原であり,その分子構造は複雑で,数多くの亜型や稀な血液型が存在する¹⁾.中でも,発現されている D 抗原に

量的異常を認める亜型には weak D²⁾や D_{el}がある.特に,D_{el}は D 抗原陰性確認試験でも検出できないほど D 抗原の発現量は少なく,通常では抗 D 血清による吸着解離試験によってのみ確認され

る³⁾。現在、D_eはRhD陰性に分類されているが、D_eには完全なRHD遺伝子が存在することが明らかになり、D抗原が微量ながらも発現している可能性が指摘されている⁴⁾。

今回、過去に抗D保有歴を持つRhD陰性患者において、D陰性血を輸血していたにもかかわらず輸血後に抗Dが陽転した症例を経験した。輸血ドナーのD抗原の有無およびハプロタイプについて遡及調査を行い、抗D産生の原因について調査した。また、産生された抗Dの血清学的性状についても検討したので報告する。

症 例

67歳女性、B型、Rh陰性、ccee。20年前に消化管出血による貧血に対してRhD陽性赤血球が輸血され、その後に抗D産生が確認されていた。

2000年7月14日、下血によりヘモグロビン(Hb)値が4.1g/dLに低下し、貧血改善の目的でRhD陰性濃厚赤血球1単位が輸血された。以後、2001年1月30日までに計28単位(19本)のRhD陰性血を輸血された。尚、この間に不規則抗体スクリーニングが輸血前に3回実施されているが、すべて陰性であった。

2001年2月28日、反復する下血によってHb値が5.8g/dLと低下したため、濃厚赤血球輸血がオーダーされた。その際に実施された抗体スクリーニングが陽性となり、パネルセルスタディから抗Dが同定された。

方 法

1. 輸血前検査

不規則抗体スクリーニングおよび交差適合試験は、カラム凝集法(BioVue, オーツ)にて酵素法(プロメリン一段法)、LISS-IAT(low ionic strength saline-indirect antiglobulin test)法を用いて施行した。抗体同定には試験管法による食塩液法、酵素法及びPEG(polyethylene glycol)IAT法の3法を併用した。不規則抗体スクリーニング及び抗体同定用のパネル血球試薬には、サージスクリーン、Di[®]血球、リゾルブパネルA(オーソ)を用いた。また、D陰性確認試験にはバイオクロン抗D(ポリクローナルブレンド, オーツ)、抗Dモノクロ三光(ヒト由来モノクローナル抗体、三

光純薬)を用い、間接抗グロブリン法を用いて実施した。さらに、抗体価はPEG-IAT法を用いて検査した。

2. 抗D特異性の確認試験

1) 抗G確認のための吸着解離試験⁵⁾: 抗Dを含む患者血清をCcdee(C+D-G+)血球と37℃、30分反応させ、3,000rpm、5分間遠心分離後、吸収上清を採取した。次に、Ccdee血球沈渣を4回洗浄し、DT解離液II(オーソ)を用いて抗体を解離した。さらに、その抗体解離液をccDEE(C-D+G+)血球を用いて同様に吸収し、吸収上清と抗体解離液を得た。それぞれの吸収上清および抗体解離液は、リゾルブパネルA(オーソ)と反応パターンから特異性を決定した。

2) DTT(dithiothreitol)処理血球との反応性⁶⁾: 洗浄したパネル血球1容に対し、0.01M DTT(pH8.0)を1容を加え、DTTの最終濃度0.005Mとして37℃で30分間インキュベートした。DTT処理血球は4回洗浄後、3~5%浮遊液とし、血球浮遊液1滴に対し患者血清2滴を加え、PEG-IAT法により検査した。

3. ドナー検査

ドナーのRhD抗原は、モノクローナル抗D(日本赤十字社製)を用い、自動検査装置(PK7200, オリンパス)でスクリーニングした。スクリーニング陰性の場合、モノクローナル抗D及びポリクローナル抗D(オーソ)による手法(間接抗グロブリン法)にて確認した。RhD以外のC, c, E, e抗原については、各種バイオクロンRh式血液型判定用抗血清(オーソ)を用いて判定した。輸血された19ドナー全てのD陰性確認試験およびRhフェノタイピングは、福島県赤十字血液センターにて再検した。

結 果

2001年1月30日の最終輸血から約1カ月後の2月28日に実施された不規則抗体スクリーニングは陽転し、抗体同定検査から抗D抗体が検出された。凝集反応は酵素法、PEG-IAT法において3+~4+を認め、その抗体価は8倍(PEG-IAT法)であった。尚、この時の直接抗グロブリン試験は陰性であった。

また、検出された抗体が抗 D 単独であるかを確認するために、被検血清と 2 種類の D 血球 (Ccdee および ccDEE) による吸着解離試験を実施した。その結果、解離液および上清中の抗体検査から抗 G の存在は認められず、抗 D 単独であることが判明した (Table 1)。また、DDT 処理血球との反応でも同様に抗 D 特異性が認められたことから、検出された抗体が抗 LW である可能性は否定された。

輸血開始から抗 D が陽転するまでの期間 (2000 年 7 月 14 日 ~ 2001 年 2 月 28 日) における輸血前後の臨床データを示す (Fig. 1)。輸血後の Hb 値は

良好に上昇し、LD 値には著明な変化を認めなかった。また、輸血後の副作用チェック用紙には“特変なし”の記述があり、カルテにも溶血性輸血副作用を示唆する記述はなかった。

輸血した 19 本の RhD 陰性確認試験の結果は全て陰性であり、D 抗原は検出されなかった。輸血した 19 本の Rh フェノタイプは、ccdEe が 6 本、ccdee が 7 本、Ccdee が 2 本、ccdEE が 1 本、CcdEe が 3 本であった。また、献血履歴では供血者 19 人中初回献血者は 4 人のみで、他は複数回献血者であった。

Table 1 Results of adsorption-elution procedures for the recognition of anti-D or anti-G in the patient's serum

Phenotype of RBCs used for the first adsorption	Ccdee (D - C+ G +)
Antibody present in the adsorbate	anti-D
Antibody present in the first eluate	none
Phenotype of RBCs used for the second adsorption	ccDEE (D + C - G +)
Antibody present in the adsorbate	none
Antibody present in the second eluate	none

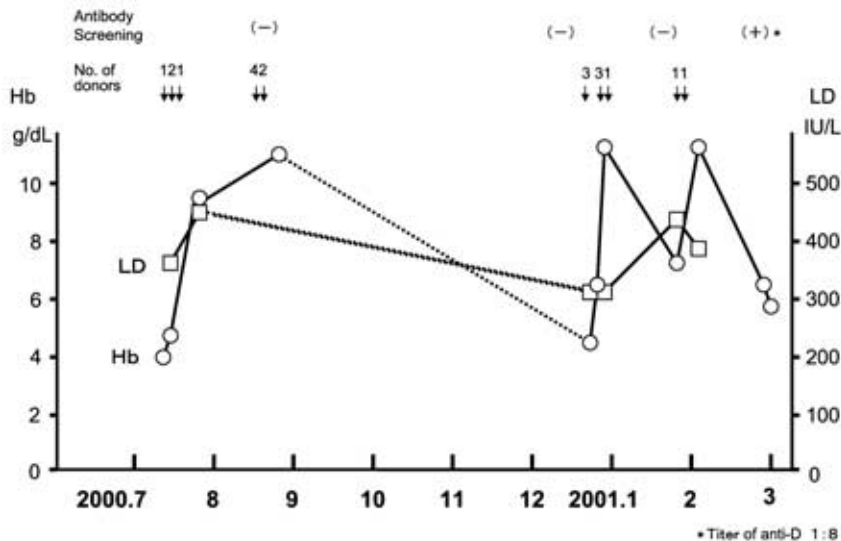


Fig. 1 Clinical data until the development of anti-D by transfusion of RBCs from apparently D-negative donors
 open circles : levels of hemoglobin concentration
 open squares : levels of lactate dehydrogenase

考 察

過去に抗 D 保有歴のある患者において, D 陰性の濃厚赤血球を輸血していたにもかかわらず, 抗 D 産生を再び起こした症例について報告した. そこで, 輸血ドナーの中に D 陽性または weak D が含まれていた可能性を考慮し, 日赤血液センターに D 抗原タイピングの再検を依頼した. 遡及調査の結果から, ドナー 19 人すべての D 抗原は血清学的に陰性であったことが再確認された.

日本人における RhD 陰性者のほとんどは, *RHD* 遺伝子の欠失により D 抗原が発現されない. しかし, RhD 陰性であるにもかかわらず抗体解離試験を実施すると, 抗 D が微量に解離される赤血球がその約 10% に存在し, 血清学的には D_{el} として分類されている. 福森らは, 血清学的に RhD 陰性または D_{el} とタイプされた日本人ドナー 306 人を対象に *RHD* 遺伝子について調査し, *RHD* 遺伝子の有無と Rh フェノタイプとの関連性について検討した⁷⁾. その結果 抗体解離試験が陽性であった D_{el} ドナー 102 名全員が Ce を有し, ce や cE のハプロタイプは認めなかったことから, D_{el} には Ce ハプロタイプが密接に関与していると考えられている. そこで, 本症例で検出された抗 D の免疫刺激に D_{el} 血球が関与した可能性を考慮し, ドナー 19 名のハプロタイプについて血清学的に調査した. 本症例に輸血された 19 本の赤血球うち 5 本が C と e 抗原を保有していたことから, これら 5 人のドナー中に D_{el} が含まれていた可能性が疑われた.

本症例の抗 D が, C 抗原を有する D_{el} 血球によって産生された抗体であるならば, C と D に共通な抗原エピトープ G に対する抗体, すなわち抗 G が共存する可能性も考えられたが, 結果から否定された. また, 抗 D 様の特異性を示す抗体には抗 LW がある⁸⁾. LW 抗原はパパインやフィシンによって影響は受けないが, sulfhydryl 試薬や pronase によって失活することから, 抗 LW との鑑別のため DTT 処理赤血球との反応性について検討した結果, 本抗体は抗 D であることが確認された.

最近, Wagner らは D_{el} ドナーからの輸血によって抗 D が産生された D 陰性症例について報告し⁹⁾, 1) D_{el} 血球でも 1 次免疫応答により抗 D 産生を誘導することが可能であること. 2) モノクローナル抗体を用いた検討から, D_{el} 血球にも正常な D 抗原エピトープが存在することを示唆している. 我々の症例は, 過去に抗体保有歴を有していることから, 検出された抗 D は 2 次免疫応答の結果として産生されたものと考えられる.

本症例の抗 D 産生に D_{el} の関与を証明するためには, 今後, 輸血ドナーの D_{el} 遺伝子解析を行い, 抗 D 産生との因果関係について調査する必要がある.

結 語

過去に抗 D 抗体産生の既往がある患者において, 交差適合試験で適合した RhD 陰性血を輸血したにもかかわらず, 抗 D が再出現した症例について報告した.

文 献

- 1) 陶山公太: Rh 血液型の分子レベルでの考察. 日本輸血学会誌, 45: 1-10, 1999.
- 2) 松田利夫: Partial D と Weak D (D^u) 判定と意義. 日本輸血学会誌, 45: 11-19, 1999.
- 3) 植野正秋, 新保貴美子, 古沢 彰, 他: Del について. 日本輸血学会誌, 31: 497-499, 1985.
- 4) 石川善英, 常山初江, 内川 誠, 他: 日本人の RhD_e アリルとその遺伝子タイピング法. 日本輸血学会誌, 50: 710-713, 2004.
- 5) Issitt PD, Anstee DJ: Applied blood group serology, 4th ed, North Carolina Montgomery Scientific Publications, 1998, 350-352.
- 6) 柴田 洋一 監訳: AABB 編 Technical Manual 13th ed, <日本語版>, オリンパス光学株式会社, 東京, 2002, 729-730.
- 7) Fukumori, Y., Hori, Y., Ohnoki, S.: Further analysis of D_{el} (D-elute) using polymerase chain reaction (PCR) with *RHD* gene-specific primers. Transfus Med, 7: 227-231, 1997.
- 8) 柴田 洋一 監訳: AABB 編 Technical Manual 13th ed, <日本語版>, オリンパス光学株式会社, 東京, 2002, 325-326.
- 9) Wagner, T., Kormoczi, G.F., Buchta C., Vadon, M., et al: Anti-D immunization by DEL red blood cells. TRANSFUSION, 45: 520-526, 2005.