

De<sub>e</sub>型 MAP 加赤血球濃厚液により抗 D 抗体価が著明に上昇した D 陰性の 1 例佐久間香枝<sup>1)2)</sup> 久保 紀子<sup>1)</sup> 西村 加世<sup>1)</sup> 高橋 直美<sup>1)</sup> 高木 朋子<sup>1)</sup>武田 敏雄<sup>1)</sup> 國友由紀子<sup>1)</sup> 原口 京子<sup>1)</sup> 比留間 潔<sup>1)</sup> 奥山 美樹<sup>1)</sup>

我々は、D 抗原陰性者に対し D 陰性の赤血球輸血を行っていたにもかかわらず、抗 D 抗体価がクームス法で最高 4,096 倍と著しく上昇した症例を経験した。輸血に使用された血液製剤の遺伝子解析を行なったところ、D<sub>e<sub>e</sub></sub>型赤血球の特徴である *RHD* 遺伝子の 1227 番目がグアニンからアデニンに置換している製剤が含まれていたことが明らかとなった。

したがって本症例は D<sub>e<sub>e</sub></sub>型赤血球の輸血により、D 抗原の感作を受け、抗 D 抗体を産生したと考えられた。なお、輸血後明らかな溶血の所見は認められなかった。

通常の D 陰性血の中には D<sub>e<sub>e</sub></sub>型が含まれていることがあり、D<sub>e<sub>e</sub></sub>型赤血球輸血が D 陰性者に抗 D 抗体を産生させる可能性があることは十分認識するべきであると思われた。

キーワード：D 抗原陰性、抗 D 抗体、D<sub>e<sub>e</sub></sub>型赤血球、*RHD* 遺伝子、PCR-SSP 法

第 55 回日本輸血・細胞治療学会総会座長推薦論文

## はじめに

D 抗原 (RhoD) 陰性者の多くは *RHD* 遺伝子を欠損しているが、D 陰性と判定された中には、*RHD* 遺伝子を持っていながら D 抗原の発現が極めて弱いために D 陰性と判定される場合がある。中でも抗グロブリン試験を含む D 陰性確認試験を行なっても D 陰性と判定され、抗 D 吸着解離試験を行なうことによってはじめて D 抗原を検出できる例があり、このような血液型は D<sub>e<sub>e</sub></sub>と呼ばれている<sup>1)~3)</sup>。日本人においては、D<sub>e<sub>e</sub></sub>は D 陰性と判定された中の約 10% に認められ、C 抗原を合わせ持つことが多いとされている<sup>4)</sup>。

一方、D 陰性の患者の輸血の際には、緊急時などを除き D 陰性の血液を選択して、抗 D 抗体の産生を予防するのが原則であるが、D 陰性血の中に含まれる D<sub>e<sub>e</sub></sub>をあらかじめ明らかにし排除することは、現状では困難である。したがって、D 陰性患者に D<sub>e<sub>e</sub></sub>血球が輸血される可能性があるが、これまでは D<sub>e<sub>e</sub></sub>血球の抗原性は弱いため臨床問題にならないとされてきた。しかし、最近 D<sub>e<sub>e</sub></sub>血球の輸血によって抗 D 抗体を産生したとする報告もみられてきており、必ずしも軽視できないと考えられる<sup>5)6)</sup>。

今回、D 陰性患者に対し D 陰性血の輸血をしていた

にもかかわらず抗 D 抗体が著しく高値になった症例を経験した。輸血した D 陰性血液の中に D<sub>e<sub>e</sub></sub>型が含まれていたことが判明したため、D<sub>e<sub>e</sub></sub>血球により抗 D 抗体が産生されたと考えられたので報告する。

## 方 法

不規則抗体スクリーニングと同定試験は、カラム凝集法 (オートビュー Innova, オーツ・クリニカル・ダイアグノスティックス) を用いて、low ionic strength saline-indirect antiglobulin test (LISS-IAT) 法、酵素 (ficin) 法で行った。不規則抗体スクリーニング、抗体同定用のパネル血球試薬は、それぞれバイオビュースクリーン J、およびリゾルブパネル C (オート・クリニカル・ダイアグノスティックス) を用いた。

D 抗原確認試験には、バイオクロン抗 D (ポリクローナルブレンド, オーツ・クリニカル・ダイアグノスティックス)、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)、オート抗 D 血清 (ヒト由来ポリクローナル抗体, オーツ・クリニカル・ダイアグノスティックス) を用い、間接抗グロブリン法を用いて実施した。

D 以外の C, c, E, e 抗原検査は、各種バイオクロン

1) 東京都立駒込病院輸血・細胞治療科

2) 東京都立大塚病院検査科

〔受付日：2009 年 7 月 22 日，受理日：2009 年 12 月 3 日〕

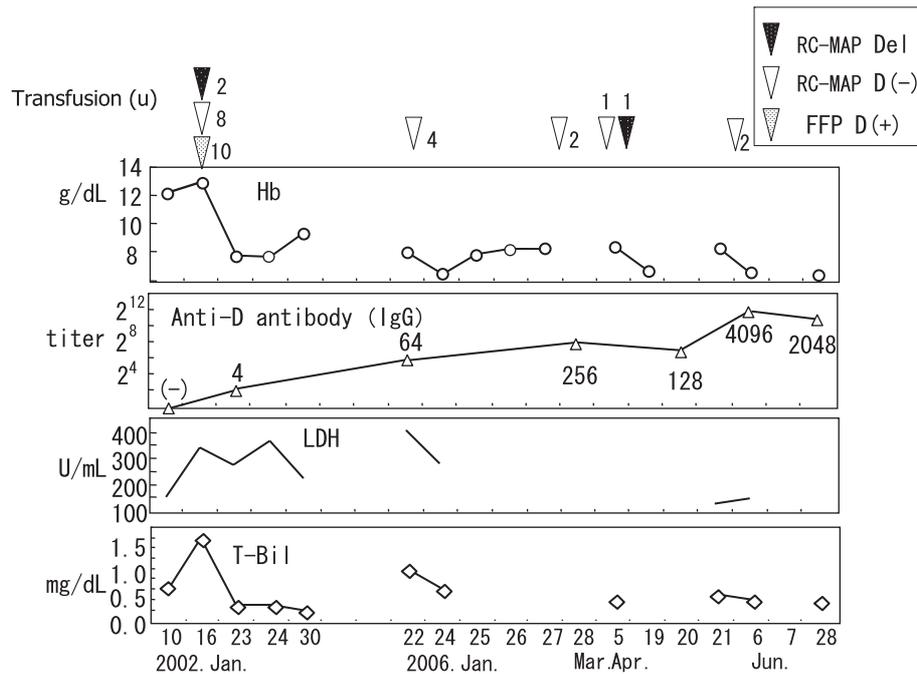


Fig. 1 Clinical data of the patient after transfusions

ン Rh 式血液型判定用抗血清(オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス)を用いて行なった。

抗 D 吸着解離試験には, 抗 D 血清(ヒト由来ポリクローナル抗体, オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス)を使用し, 37°C で 1 時間反応させ, 3,000rpm で 5 分間遠心後, 吸着上清を採取した。さらに, 血球沈渣を 4 回洗浄し, DT 解離液 II(オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス)を用いて抗体を解離した。

直接抗グロブリン試験は, クームス血清パイオクロン, 抗ヒト IgG 血清, パイオクロン抗 C3d, およびパイオクロン抗 C3b, C3d(オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス)を用い試験管法で行った。

輸血に用いた血液の RHD 遺伝子の解析は, 既報告の方法に従って PCR-SSP (sequence-specific primer) 法にて行ない, 遺伝子産物の塩基配列を分析した<sup>7)</sup>。なお, この解析は東京都赤十字血液センターに依頼した。

## 症例と経過

患者は 57 歳女性, A 型, Rho (D) 陰性, ccEe. 23 歳時 (1973 年) に Rho (D) 陽性の児を出産している。出産時の抗 D グロブリン製剤の使用については不明であるが, 我が国で抗 D グロブリン製剤が販売されたのは 1977 年であることから, 抗 D グロブリン製剤が普及する前の出産と思われる。2002 年 1 月 10 日, 子宮頸部腺癌治療のために当院に入院となった。輸血歴はなく, 初回入院時検査では, 抗 D 抗体は陰性であった。1 月 16 日広範子宮全摘の手術を行った際に, A 型 D 陰性の MAP 加赤血球濃厚液 (RC-MAP) 10 単位 (6 本) と D

陽性の新鮮凍結血漿 (FFP) 10 単位 (5 本) が輸血された。一週間後の 1 月 23 日, 不規則抗体スクリーニング検査で抗 D 抗体が陽性となった。このときの抗体価は, 酵素法で 8 倍, クームス法で 4 倍であった。また, 直接抗グロブリン試験は陰性であった。

その後外来で経過観察していたが, 再発所見が認められ, 外来にて化学療法を複数回施行している。また, 貧血所見の出現に伴い輸血も行われているが, この間の抗 D 抗体価は酵素法で 32~64 倍, クームス法で 64~256 倍で推移した。

2006 年 4 月 20 日原疾患再発に伴う貧血が著明となり, 当院に再入院し, D 陰性 RC-MAP 2 単位 (2 本) が輸血されたのち退院となったが, 再度貧血が進行し 6 月 6 日に輸血目的で 3 回目の入院となった。このときの不規則抗体スクリーニング検査で, 抗 D 抗体価が酵素法 4,096 倍, クームス法 4,096 倍と著明な上昇が確認された (Fig. 1)。また, 直接抗グロブリン試験は微弱ながら陽性となり, IgG タイプであった。解離液が D 陽性血球に反応し, D 陰性血球に反応しなかったことから, D に特異性のある抗 D 抗体であると判断した。Fig. 1 には輸血と溶血所見の経過も示した。貧血の進行は原疾患の悪化とそれに対して行なった化学療法に伴う骨髄抑制によるものと考えられ, 経過中血清 LDH の上昇や, 血清ビリルビン (T-Bil) 値の上昇, 血尿の出現など溶血を疑わせる所見は認められなかった。また, のちに D<sub>e</sub> と判明した血液製剤を輸血した後, あるいは抗 D 抗体価の上昇後においても同様で, 明らかな溶血所見はみられなかった。

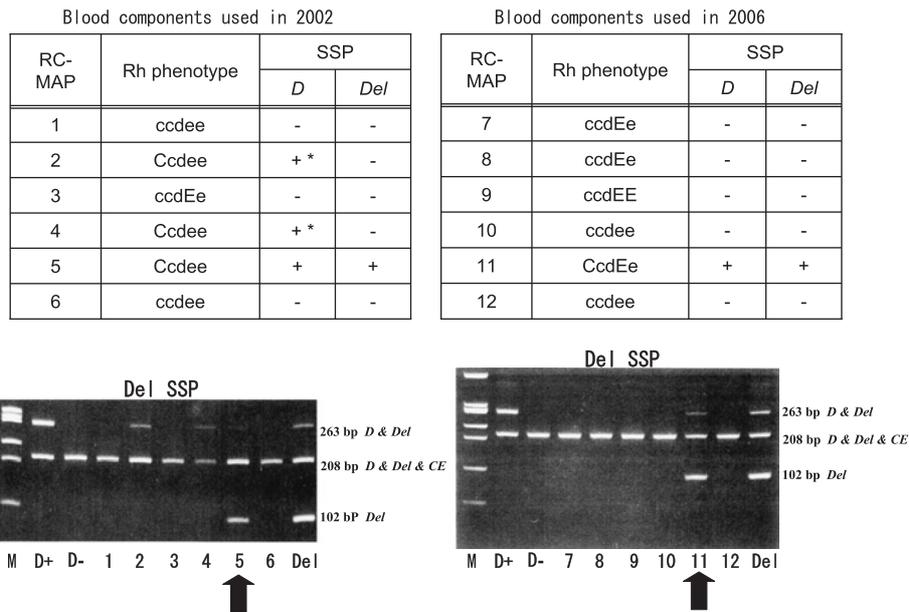


Fig 2 PCR-SSP method for analysis of blood components  
M: size marker, Del: positive control  
\*: RhD-positive in the SSP method, but no antigenicity

患者はその後原病に対する積極的な治療は行なえず、2006年7月緩和ケア目的で転院となった。

### 輸血用血液の血液型検査と遺伝子解析

2002年1月23日抗体同定検査で抗D抗体産生が確認され、2006年6月6日抗D抗体価が酵素法4,096倍、クームス法4,096倍と著明な上昇をしたことより、経過中輸血された赤血球を改めて調査した。

この間に輸血した赤血球製剤は合計17本、30単位であった(Fig. 1)。輸血したRC-MAP17本に対して行ったD陰性確認試験の結果から、全ての製剤がD陰性であることが確認できた。また、これらのRhフェノタイプは、Ccdee 3本、CcdEe 3本、ccdee 4本、ccdEe 6本、ccdEE 1本であった。

つぎに、抗D抗体価が著明に上昇した時(2006年6月6日)の患者の赤血球と、その直前(2006年4月20日)に輸血したRhD陰性RC-MAP 2u(2本)のセグメント中の赤血球を用いて、抗D吸着解離試験を行なった。結果は、RhフェノタイプCcdEeのRC-MAPセグメント中の赤血球と、患者赤血球の解離液から、それぞれ抗D抗体が検出された。そこで輸血された赤血球製剤のD<sub>e</sub>を疑い、遺伝子解析を行なった。

RHD遺伝子を持つD陰性者のほとんどはG1227A変異を共有していて、この変異とD<sub>e</sub>が強く関連するといわれている。特異的プライマーを用いたPCR-SSP法により、この変異をもつ場合には102bpのバンドが検出される<sup>7)</sup>。

2002年1月23日の手術の際に輸血されたRC-MAP

6本のうちの1本と、2006年6月6日抗D抗体価が上昇する直前に輸血されたRC-MAP6本のうちの1本で、102bpのバンドが確認でき、D<sub>e</sub>であることが判明した(Fig. 2)。このうち2006年に輸血されたRC-MAPは吸着解離で抗D抗体が検出されたものと同じ製剤である。またこれら2製剤のRhフェノタイプは各々CcdeeとCcdEeであり、いずれもCeを持つことも確認できた(Fig. 2)。

2002年1月23日の手術時使用の2本(Fig. 2 RC-MAPのLane No.2, 4)でわずかに263bpのバンドが検出されたが、No.2はRHD遺伝子が存在し変異も認められないものの、吸着解離でD陰性であることは確認できており、何らかの原因でD遺伝子が機能していないものと推定できた。No.4は増幅させたexon10が存在するものの、他のexonは増幅せず、欠損またはCE遺伝子に置き換わっているものと考えられた。

### 考 察

今回我々は、D<sub>e</sub>型赤血球製剤輸血により抗D抗体価が著明に上昇したD陰性の症例を経験した。本邦では既に佐久間らが、抗D抗体保有歴を持つD陰性患者に対してD陰性血を輸血したにもかかわらず、輸血後に抗D抗体が陽転した症例を報告しており、D<sub>e</sub>血球による抗D抗体産生への関与を指摘している<sup>5)</sup>。この症例では、D<sub>e</sub>血球輸血前にすでにD抗原の感作があり、D<sub>e</sub>血球輸血による抗D抗体価の上昇は二次免疫応答によるものと考えられている。

一方、WagnerらもD<sub>e</sub>ドナーからの輸血によって抗

D抗体が産生された症例を報告し、この場合D<sub>e</sub>血球による一次免疫応答で抗D抗体が産生されることを示唆している<sup>6)</sup>。

我々が今回示した症例は輸血歴がなく、入院時も抗D抗体は陰性であったことから、D<sub>e</sub>血球により一次免疫応答が起こり、さらに2回めのD<sub>e</sub>血球による感作で抗D抗体価が極めて高値となったことが考えられる。ただし、妊娠・出産時にD抗原による感作があったものの今回の入院時には抗体価が感度以下まで低下していた可能性や、新鮮凍結血漿に含まれる微量な赤血球による感作の報告例<sup>8)9)</sup>にみられるように、手術時に使用されたD陽性新鮮凍結血漿輸血によるD抗原の一次感作があった可能性は否定できない。しかしいずれの場合であったとしても、D<sub>e</sub>血球により抗D抗体価が著明に上昇する可能性があることが本症例で示されたものと考えられる。

2006年6月6日、抗D抗体が著しく高値を示したときの直接グロブリン試験が微弱な陽性となったのは、4月20日に輸血されて患者体内に残存しているD<sub>e</sub>血球と、産生された高力価の抗D抗体とが反応したものである。また同様に、同日の患者赤血球で行なわれた吸着解離試験も、患者体内に残存したD<sub>e</sub>血球に反応した抗D抗体が検出されたものと考えられる。

D陰性患者に輸血を行なう場合には、D陰性血を選択するのが一般的であり、特に抗D抗体を保有していることが明らかであれば、必ずD陰性血を選択しなければならない。しかし、D陰性と判定される中にD<sub>e</sub>が含まれており、日本人の場合約10%も存在することは、決して無視できない頻度である。本症例のようにD陰性患者が複数回の輸血を受ければ、感作を受ける可能性はそれだけ高くなる。我々の検索し得た範囲では、D<sub>e</sub>血球の輸血によって溶血を来した例は報告されておらず、今回の症例でも患者に遅発性溶血反応などの所見は認められなかったが、不必要な抗原感作は避けるべきである。本来D<sub>e</sub>はD陰性ではないので、陽性と扱うべきであるが、D陰性血全例に吸着解離試験

を行うことも非現実的である。したがって、C抗原陰性血を選択することでD<sub>e</sub>を回避することなども検討する価値はあると思われる。

謝辞：RHD遺伝子の解析に協力していただいた、日本赤十字社中央血液研究所の小笠原健一氏、東京都赤十字血液センターの内川誠氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 内川 誠：D抗原. 編者 遠山 博, 柴田洋一, 前田平生, 他, 輸血学, 第3版, 中外医学社, 東京, 2004, 223—231.
- 2) 堀 勇二：D抗原の変異型. 編者 認定輸血検査技師制度協議会カリキュラム委員会, スタンダード輸血検査テキスト, 第2版, 医歯薬出版, 東京, 2007, 66—68.
- 3) 伊藤道博：Rh血液型検査. 編者 認定輸血検査技師制度協議会カリキュラム委員会, スタンダード輸血検査テキスト, 第2版, 医歯薬出版, 東京, 2007, 68—74.
- 4) Okuda H, Kawano M, Iwamoto S, et al: The RHD gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. *J.Clin.Invest*, 100: 373—379, 1997.
- 5) 佐久間志津枝, 伊藤佳代, 鈴木隆幸, 他：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. *日本輸血学会雑誌*, 51: 585—588, 2005.
- 6) Wagner T, Kormoczi GF, Buchta C, et al: Anti-D immunization by DEL red blood cells. *TRANSFUSION*, 45: 520—526, 2005.
- 7) 石川善英, 常山初江, 内川 誠, 他：日本人のRhDelアレルとその遺伝子タイピング法. *日本輸血学会誌*, 50: 710—713, 2004.
- 8) Wolfowitz E, Shechter Y: More about alloimmunization by transfusion of fresh-frozen plasma. *TRANSFUSION*, 24: 544, 1984.
- 9) Connolly M, Erber WN, Gray DE: Case report: immune anti-D stimulated by transfusion of fresh frozen plasma. *Immunohematology*, 21 (4): 149—151, 2005.

## ANTI-D ANTIBODY PRODUCTION DUE TO TRANSFUSION OF DEL TYPE RBCS TO A D-NEGATIVE RECIPIENT: A CASE REPORT

Kae Sakuma<sup>1)2)</sup>, Noriko Kubo<sup>1)</sup>, Kayo Nishimura<sup>1)</sup>, Naomi Takahashi<sup>1)</sup>, Tomoko Takagi<sup>1)</sup>, Toshio Takeda<sup>1)</sup>, Yukiko Kunitomo<sup>1)</sup>, Kyoko Haraguchi<sup>1)</sup>, Kiyoshi Hiruma<sup>1)</sup> and Yoshiki Okuyama<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Transfusion and Cell Therapy, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center Komagome Hospital

<sup>2)</sup>Department of Clinical Laboratory Medicine, Tokyo Metropolitan Ohtsuka Hospital

### **Abstract:**

We experienced a case of a D-negative woman in whom anti-D antibody rose to a titer of 4,096 by Coombs' test, despite receiving a red blood cell transfusion from apparently D-negative donors. The *RHD* gene of the blood components that were transfused to her was analyzed by the PCR-SSP method, and one-point mutation G1227A was found in the gene from two blood components. This case was therefore thought to be exposed to D-antigen by blood transfusion of D<sub>e1</sub> type red blood cells, as a result of which she produced anti-D antibodies. However, no hemolytic episodes due to the anti-D antibody were found during her clinical course. It should be recognized that D<sub>e1</sub> type blood is occasionally included in D-negative blood, and that a D-negative recipient may produce anti-D antibody on blood transfusion of D<sub>e1</sub> type red blood cells.

### **Keywords:**

D-negative, Anti-D antibody, D<sub>e1</sub> type red blood cells, *RHD* gene, PCR-SSP method