

増悪時に E 抗原及び c 抗原の著しい減弱を認めた骨髓異形成症候群の 1 例

難波 宏美¹⁾ 藤原 孝記¹⁾ 金子 強¹⁾ 永友ひとみ¹⁾ 蟹井はるか¹⁾
 笠井 英利¹⁾ 大曾根和子¹⁾ 前島理恵子¹⁾ 富山 秀和¹⁾ 脇本 信博¹⁾
 白藤 尚毅¹⁾²⁾

我々は、骨髓異形成症候群 (myelodysplastic syndrome : MDS) の増悪時に E 抗原及び c 抗原が著しく減弱し、抗 E 及び抗 c 自己抗体検出時の直接抗グロブリン試験 (DAT) が陰性になる症例を経験した。

79 歳女性。2010 年 3 月に汎血球減少症の精査・加療目的で入院となった。骨髓所見は異形成を伴った赤芽球が優位で MDS (RAEB-1) と診断された。初診時の血液型は B 型 RhD 陽性、不規則抗体は間接抗グロブリン法 (IAT) 陰性であった。初診時より 55 病日に IAT が陽性となり抗 E を検出したが、DAT は陰性であった。同時に実施した Rh フェノタイプ検査では E 抗原が (w+^m)、c 抗原が (w+^m) と極めて弱い反応を示していた。その後、抗 c も検出された。骨髓細胞を用いた G-banding 法の結果、種々の染色体異常を認めたが第 1 染色体短腕に異常は認められなかった。また、PCR-SSP 法を用いた RHCE 遺伝子解析の結果、55 病日の検体において C, c, E, e の増幅が認められ、R₁R₂ (CcDEe) と判定された。

本症例は MDS の増悪に伴って E 抗原および c 抗原に著しい減弱が認められた。

キーワード：骨髓異形成症候群、E 抗原、c 抗原、抗原発現低下、自己抗体

はじめに

血液型を決定する赤血球膜抗原は疾患により抗原性が低下することが知られており、A, B, H 抗原性低下に関する報告がある¹⁾²⁾。藤田らは急性骨髓性白血病患者において A₁ 抗原の減弱と、それに伴う抗 A₁ の出現を確認している³⁾。さらに白血病や骨髓異形成症候群 (MDS) の増悪期において、Rh 血液型の抗原量が変化する症例や⁴⁾⁵⁾、1 番染色体の Uniparental isodisomy により Rh 血液型にモザイクが認められた症例も報告されている⁶⁾。

我々は、MDS の増悪時に E 抗原および c 抗原が著しく減弱し、抗 E 及び抗 c 自己抗体検出時の直接抗グロブリン試験 (DAT) が陰性になる稀な症例を経験した。

症 例

79 歳女性。2009 年 12 月頃よりめまい、食欲不振、全身倦怠感を認め 2010 年 3 月 26 日に近院を受診した。汎血球減少を認め精査・加療目的で翌 3 月 27 日に当院を紹介入院となった。入院時の血液検査では、Hb 4.3 g/dl, WBC 2,000/μl, Plt 2.2 万/μl で、血液型検査は B 型 RhD 陽性、不規則抗体検査は間接抗グロブリン法 (IAT) 陰性、直接抗グロブリン試験 (DAT) 陰性であっ

た。骨髓所見では異形成を伴った赤芽球が優位に見られ、染色体検査結果より骨髓異形成症候群 (MDS RAEB-1) と診断された。治療は高齢のため週一回外来で輸血と点滴 (ハイドロコートン水溶液等) を行い、化学療法は実施しなかった。5 月より汎血球減少が増悪、7 月 25 日には胸部痛にて緊急入院しセフトリアキソンナトリウム水和物 (CTRX : セフェム系) を投与、さらに 7 月 26 日から 3 日間セフェピム塩酸塩水和物 (CFPM : セフェム系) を使用した。しかし、全身状態の悪化により 7 月末御永眠された。

材料及び方法

患者検体

交差適合試験用及び輸血副作用時の遡及調査用として抗凝固剤 EDTA-2K を用いて採血された患者末梢血を使用した。

Rh フェノタイプ検査

初診時と 8, 20, 27, 33, 55, 62 病日の 7 検体について Rh フェノタイプ検査を実施した。抗体はバイオクロン[®] Rh 血液型判定用抗 C, c, E, e (Ortho Clinical Diagnostics, NJ, USA) を使用した。

1) 帝京大学医学部附属病院輸血・細胞治療センター

2) 帝京大学医学部血液内科

〔受付日：2012 年 12 月 10 日，受理日：2013 年 8 月 23 日〕

Table 1 Reactivity of the patient's red blood cells to anti-C, anti-c, anti-E, and anti-e antibody

	Day 0	Day 8	Day 20	Day 27	Day 33	Day 55
Anti-C	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Anti-c	3+	3+	2+	1+	1+	w + ^{mf}
Anti-E	3+	2+ ^s	1+	w + ^{mf}	w + ^{mf}	w + ^{mf}
Anti-e	3+	3+	3+	3+	3+	3+

直接抗グロブリン試験 (DAT)・解離試験

初診時, 8, 20, 27, 33, 55, 62 病日の患者赤血球 7 検体を用いた DAT および各患者赤血球に対応する病日の自己血漿を用いたポリエチレングリコール-間接グロブリン試験 (PEG-IAT) を実施した. DAT にはガンマクロン抗 IgG3d, 抗 IgG, 抗 C3bC3d (IMMUCOR GAMMA, GA, USA), PEG-IAT にはガンマペグ (IMMUCOR GAMMA) を使用した. DAT が陽性となった検体に対してグリシン酸解離システム (IMMUCOR GAMMA) を用いて抗体解離試験を行った.

不規則抗体スクリーニング・抗体同定検査

初診時から 8, 20, 27, 33, 55, 62, 69, 75, 83, 90, 97, 104, 111, 118 病日までの患者血漿 15 検体に対して不規則抗体スクリーニング及び抗体同定検査を実施した. 検査は生理食塩水法, 反応増強剤として重合ウシアルブミン液 (Ortho Clinical Diagnostics) を用いたアルブミン-間接抗グロブリン試験 (Alb-IAT), 酵素法 (プロメリン-一段法, 調整) を実施した. パネル赤血球試薬は, 抗体スクリーニングにサージスクリーン[®] (Ortho Clinical Diagnostics) およびディエゴ A (Di^a) 血球 (Ortho Clinical Diagnostics) を, 抗体同定にリゾルブパネル[®]A, リゾルブパネル[®]B (Ortho Clinical Diagnostics) およびパノセル 10 (IMMUCOR GAMMA) を使用した.

RHCE 遺伝子解析

初診時と 55 病日の患者末梢血白血球より QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いてゲノム DNA を抽出した. Gassner らの方法に従い⁷⁾, RHCE 遺伝子を polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP) 法にて解析を行った. PCR 反応には GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, USA) を用い 94°C 120 秒後, 94°C 10 秒 65°C 60 秒を 10 サイクル, その後 94°C 30 秒 61°C 60 秒 72°C 30 秒を 30 サイクル行った. PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し, 0.5µg/ml のエチジウムブロマイドで 5 分染色して増幅の有無より RHCE 遺伝子を判定した.

染色体検査

3 病日と 124 病日の患者骨髄組織に対して G-banding 法にて染色体検査を行った.

結 果

Rh フェノタイプ検査

Table 1 に Rh フェノタイプ検査の結果を示す. E 抗原は (3+) から徐々に減弱し, 20 病日には (1+), 55 病日には (w +^{mf}) と低下していた. c 抗原も 20 病日には (2+), 55 病日には (w +^{mf}) と同様に低下していた. 輸血された赤血球製剤の Rh フェノタイプは初診時のみ R₁R₂ (CcDEe) であり, それ以降は R₁R₁ (CCDee) であった (Fig. 1). D, C, e 抗原に減弱は認めなかった.

直接抗グロブリン試験・解離試験

DAT は, 8 から 33 病日までの 4 検体で陽性となり, 抗グロブリン血清の特異性は抗 IgG に陰性, 補体のみ陽性であり (Fig. 1), 抗体解離試験は陰性であった. さらに感度を上げるため PEG[®] を用いた患者赤血球と当該病日の自己血漿との反応性について検査した結果, 20 から 55 病日まで陽性となったが, 抗体解離試験はスクリーニング用パネル赤血球すべてに強く反応したため特異性を確認できなかった.

不規則抗体スクリーニング・抗体同定検査

不規則抗体検査の結果は冷式抗体は検出されず, プロメリン法にて 55 から 118 病日まで抗 E を検出し, 83 から 111 病日にはさらに抗 c を検出した (Fig. 1). Alb-IAT は 55 病日の検体において抗 E を検出したが, 118 病日には陰性化した (Fig. 1). 検出された抗 E と抗 c は自己抗体と判断したが, 55 病日以降は E 抗原及び c 抗原陰性の赤血球製剤を輸血した.

RHCE 遺伝子

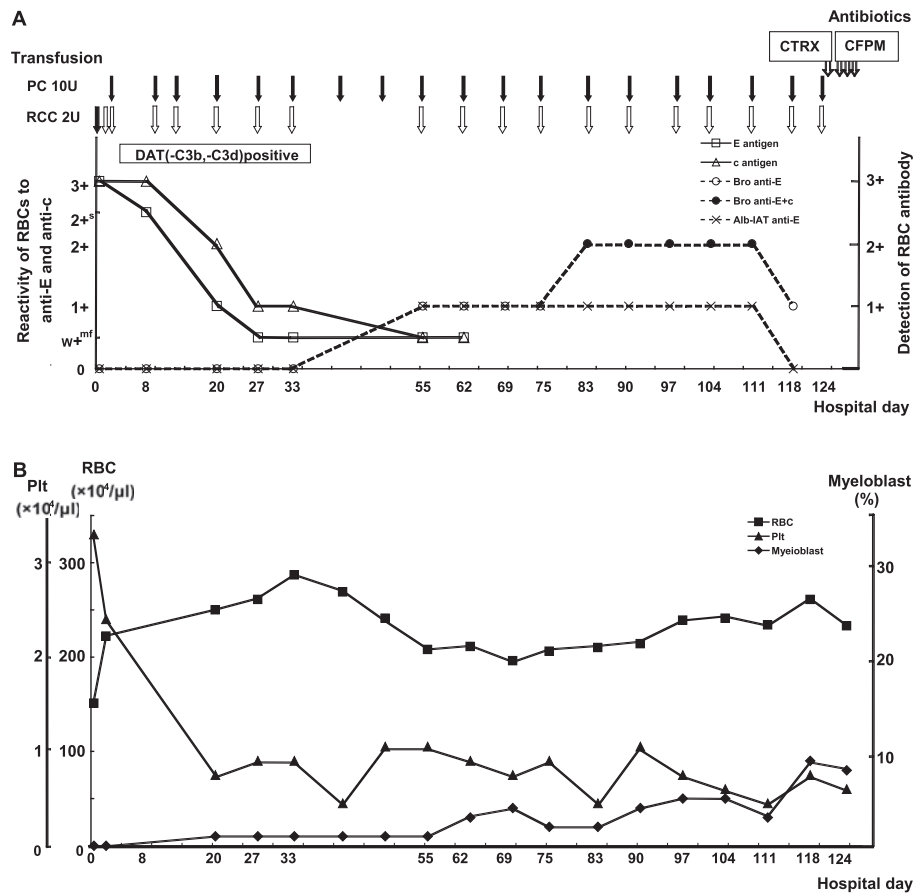
PCR-SSP 法による RHCE 遺伝子解析の結果, 全ての検体において C, c, E, e の増幅が認められた (Fig. 2).

染色体検査

G-banding 法による染色体検査の結果を Fig. 3 に示した. 3 病日より染色体異常が認められており (Fig. 3A), 124 病日では染色体異常が増加していた (Fig. 3B) が, 第 1 染色体短腕に異常は認められなかった.

考 察

MDS は骨髄組織及び末梢血の血球形態・機能の異常を示す疾患である. また, MDS は多数の遺伝子異常の



Black arrow RCC: R₁R₂ (CcDEe) red cell concentrate
 White arrow RCC: R₁R₁ (CCDEe) red cell concentrate
 PC: Platelet concentrate
 CTRX: Ceftriaxone Sodium Hydrate
 CFPM: Cefepime Dihydrochloride Hydrate
 RBC: red blood cell, Plt: Platelet

Fig. 1 Clinical course

A: The upper frame shows the administered antibiotics considered to have had an effect on DAT. Thus, the transfused blood product (RCC, PC) and the test result.

B: Blood RBC (×10⁴/μl), Plt (×10⁴/μl) and Myeloblast (%).

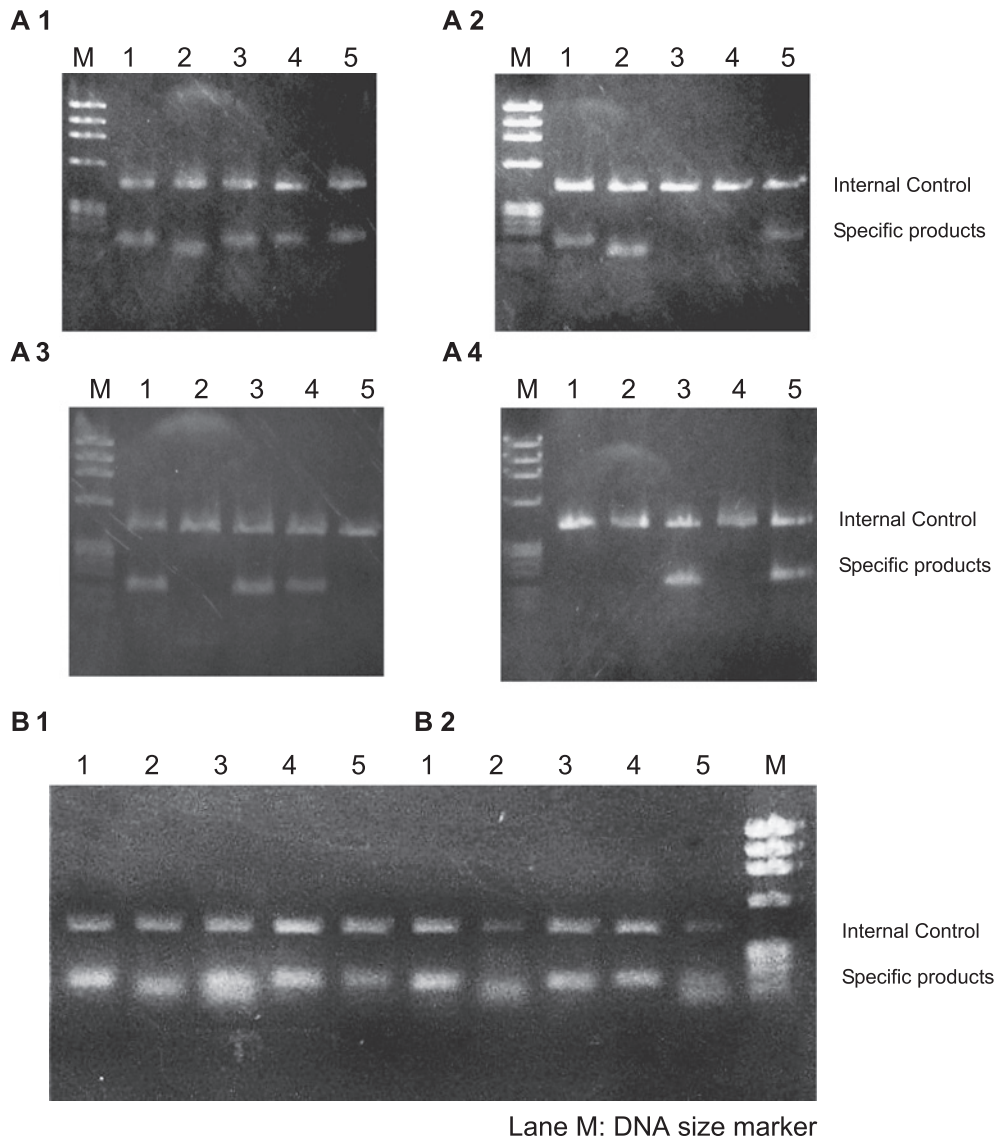
Duration of DAT (+) was between day 8 to day 33. Both reactivity of E and c antigens decreased gradually. On the 55th day, anti-E was detected by IAT. On day 83, anti-c was also detected by the Bromerlin method.

積み重ねが必要とされており、引き金により生じたDNA障害が遺伝子不安定を引き起こし、さらに遺伝子異常や染色体異常など付加異常が蓄積していくと考えられている⁹⁾。さらに種々の免疫異常も見られ、免疫グロブリン増加や赤血球の自己抗体などが認められることがある。MDSの患者で抗原の減弱なく自己抗eを産生した症例を鈴木らは報告している¹⁰⁾。

このような骨髄性悪性腫瘍患者の血液型抗原の減弱に関して多くの報告がなされており、BiancoらはA、B抗原消失患者の17%で前駆体H抗原の欠失を認め、O型患者の21%でもH抗原の低下が見られたと報告して

いる¹¹⁾。骨髄性悪性腫瘍患者の55%でABH抗原の変化を確認し、ABH抗原の欠失はABO遺伝子のプロモーターに対するDNAメチル化によるABOアリル発現の消失によるとの報告もあり、徐々にその原因も解明されてきている¹²⁾。またRh抗原でもエクソンの欠如によりRhDの消失を認めた症例や骨髄細胞に認められた第1染色体上のヘテロ接合体消失(LOH)によりRhフェノタイプがモザイクとなった症例もある¹³⁾¹⁴⁾。

本症例ではMDS(RAEB-1)の患者において55病日に抗Eを検出し、DATが陰性であったことから同種抗体の存在を考えRhフェノタイプ検査を実施した。E、



Reaction	1	2	3	4	5
Specificity for in Exon	D/C	C	c	E	e
	2	1	2	5	5
at nucleotide(s)	201	48	201	787	787
	307		307		
Product(bp)	148	112	149	158	158

Fig. 2 PCR-SSP results of RHD/CE phenotypes. Panels A1 to A4 show agarose gel electrophoresis of RH PCR-SSP performed with DNA from a person with known Rh phenotypes. A1 through A4 represent common Rh phenotypes (CcDEe, CCDee, ccDEE, ccdee). B1 and B2 show patient samples on day 0 and day 55. The PCR numbers are given at the top of each panel group. Line No 1-5 indicates the reaction No in the lower table. On day 0 and day 55, samples showed normal RHC, RHc, RHE, RHe amplification.

c 抗原は初診時の (3+) から (w +^{mf}) と徐々に減弱していた (Table 1, Fig. 1). 輸血された赤血球製剤の Rh

フェノタイプは初診時のみ R_iR₂ (CcDEe) であり, それ以降は R_iR₁ (CCDee) であったことから, 55 病日の

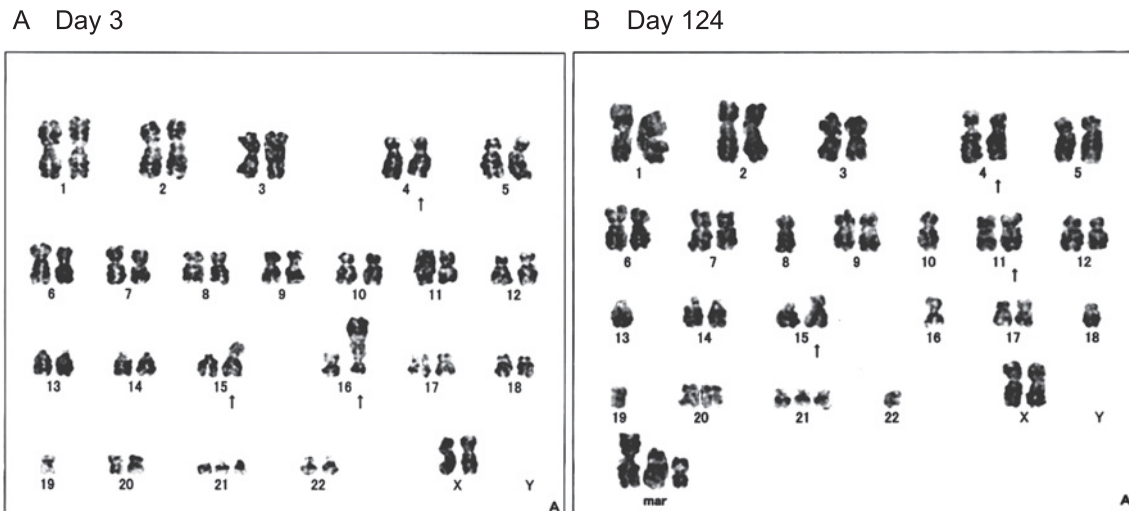


Fig. 3 Bone marrow chromosomal analysis using the G-banding stain

A: 46, XX, add (4) (q21), add (15) (p11.2), add (16) (p11.2), -19, +21

B: 43, XX, add (4) (q21), -8, -10, del (11) (p?), -13, add (15) (p11.2), -16, -18, -19, +21, -22, +3mar

There was no abnormality in the short arm of chromosome-1 although many chromosomal aberrations were detected in her marrow cells.

E, c 抗原の極めて弱い反応は抗原減弱の可能性が考えられた。また、免疫グロブリン製剤の使用が無いことから、検出された抗 E は自己抗体と判断したが、55 病日以降は E, c 抗原陰性の赤血球製剤を輸血した。DAT は 8 から 33 病日まで補体のみ陽性、20 から 55 病日まで自己の PEG-IAT が陽性となったが、薬剤以外の可能性が考えられた。RHCE 遺伝子の解析では、初診時及び抗 E が検出された 55 病日において、RHC, RHc, RHe, RHe すべてが陽性であった。また、骨髓細胞を用いた染色体検査において RHCE 遺伝子の存在する第 1 染色体短腕の異常は認められなかった。

今回の症例は CcDEe から CCDee となったが、Mertens らも MDS の患者において CcDee から ccdee へ変化したが RHD 及び RHCE 遺伝子に異常を認めなかった症例を報告しており¹⁵⁾、MDS の進行過程で下方制御する遺伝子が活性化され、遺伝子の発現を抑制している可能性が示唆された。

本論文の内容は、第 59 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2011 年) において報告した。

文 献

- 1) 浅井隆善, 伊藤国明, 杉浦ゆり, 他: 経過中に血液型 A 抗原, H 抗原が消失した急性骨髓芽球形白血病の 1 例. 臨床血液, 24 (7): 881—886, 1983.
- 2) 西村要子, 松尾裕子, 島村直子, 他: 白血病による血液型変異の 2 症例. 衛生検査, 32 (6): 838—842, 1985.

- 3) 藤田敦子, 藤澤 信, 大島理加, 他: 初診時 ABO 血液型がオモテ, ウラ不一致を示した急性骨髄性白血病. 臨床血液, 49 (1): 51—54, 2008.
- 4) Cooper B, Tishler PV, Atkins L, et al: Loss of Rh antigen associated with acquired Rh antibodies and a chromosome translocation in a patient with myeloid metaplasia. Blood, 54: 642—647, 1979.
- 5) Majsky A: Some cases of leukemia with modification of the D(Rh₀)-receptor. Neoplasma, 14: 335—344, 1967.
- 6) Miyosi O, Yabe R, Wakui K, et al: Two Cases of Mosaic RhD Blood-Group Phenotypes and Paternal Isodisomy for Chromosome 1. American Journal of Medical Genetics, 104: 250—256, 2001.
- 7) Gassner C, Schmarda A, Kilga-Nogler S, et al: RHD/CE typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primer. Transfusion, 37: 1020—1026, 1997.
- 8) Okutsu M, Ohto H, Yasuda H, et al: Increased detection of clinically significant antibodies and decreased incidence of delayed haemolytic transfusion reaction with the indirect antiglobulin test potentiated by polyethylene glycol compared to albumin: a Japanese study. Blood Transfus, 9: 311—319, 2011.
- 9) Rosenfeld C, List A: A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. Leukemia, 14: 2—8, 2000.
- 10) 鈴木由美, 益満 薫, 中尾 勉, 他: 抗 e 自己抗体が認められた骨髓異形性症候群の 1 例. 日本輸血学会雑誌, 40 (6): 1073, 1994.

- 11) Bianco T, Farmer BJ, Sage RE, et al: Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies. *Blood*, 97: 3633—3639, 2001.
- 12) Bianco-Mitto T, Hussey Dj, Day TK, et al: DNA methylation of the ABO promoter underlies loss of ABO allelic expression in a significant proportion of leukemic patients. *PLoS One*, 4: e4788, 2009.
- 13) Murdock A, Assip D, Hue-Roye K, et al: RHD deletion in a patient with chronic myeloid leukemia. *Immunohematology*, 24: 160—164, 2008.
- 14) Körmöczy GF, Dauber EM, Haas OA, et al: Mosaicism due to myeloid lineage restricted loss of heterozygosity as cause of spontaneous Rh phenotype splitting. *Blood*, 110: 2148—2157, 2007.
- 15) Mertens G, Gielis M, Muylle L, et al: Loss of D and C expression in chronic myelomonocytic leukemia. *Transfusion*, 37: 880—881, 1997.

MARKED DECREASE EXPRESSION OF E AND c ANTIGEN DURING EXACERBATION OF MYELODYSPLASTIC SYNDROME

*Hiromi Namba*¹⁾, *Koki Fujiwara*¹⁾, *Tsuyosi Kaneko*¹⁾, *Hitomi Nagatomo*¹⁾,
*Haruka Kani*¹⁾, *Hidetoshi Kasai*¹⁾, *Kazuko Osone*¹⁾, *Rieko Maejima*¹⁾,
*Hidekazu Tomiyama*¹⁾, *Nobuhiro Wakimoto*¹⁾ and *Naoki Shirafuji*¹⁾²⁾

¹⁾Department of Transfusion Medicine and Cell-processing, Teikyo University School of Medicine

²⁾Department of Hematology, Teikyo University School of Medicine

Abstract:

Changes on the expression of Rh blood-group antigens have been observed when hematologic malignancies progressed. It is reported that mosaic uniparental isodisomy on chromosome 1 induces unusual Rh blood-group phenotypes, showing both RhD positive and RhD negative erythrocyte cell-populations. Here we report on the loss of E and c antigen-expressions during exacerbation of myelodysplastic syndrome (MDS), in which anti-E autoantibody was detected by indirect antiglobulin test (IAT) but not by direct antiglobulin test (DAT).

A 79-year-old Japanese female was admitted to our hospital to undergo a detailed examination and treatment of her pan-cytopenia in March, 2010. In the bone marrow abnormal erythroblasts were dominantly observed, and chromosomal analysis revealed complex aberrations, including monosomy 19, and trisomy 21. She was diagnosed with MDS (RAEB-1). Periodical transfusion was selected for medical treatment because of her advanced age. On first admission, the examination on blood cell type proved to be B type RhD positive, and antibodies to red blood cells were negative by IAT. On the 55th day after first admission, anti-E was detected by IAT; however, DAT was negative. At that time, reactivity of patient red blood cells was (w + ^m) to both anti-E and anti-c. On day 83, anti-c was also detected by the Bromelin method. There was no abnormality in the short arm of chromosome 1 although many chromosomal aberrations were detected in her marrow cells with the G-banding method. Moreover, *RHCE* gene analysis of the day-55 sample showed normal *RHC*, *RHc*, *RHE*, and *RHe* with PCR-SSP, which showed that this phenotype was R₁R₂ (CcDEe).

These results indicate that decrease expression of E and c antigen is associated with the exacerbation of MDS in our patient.

Keywords:

Myelodysplastic syndrome, E antigen, c antigen, Decreased antigen expression, Autoantibody