

Rh (D) 陰性赤血球製剤輸血後に抗 D を検出した Rh (D) 陰性の 1 症例

小林 清子 松本 慎二 新井 瑞紀 渡邊 保加 前田 麻衣

棚澤 敬志 福永 祥子 平山美津江 池淵 研二

今回我々は、輸血前検査で Rh (D) 陰性、不規則抗体陰性と確認された患者に Rh (D) 陰性赤血球製剤を輸血後、抗 D を検出した症例を経験した。日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センターに使用製剤の DEL 確認試験と遺伝子解析を依頼した結果、使用した 5 バッグ (8 単位) 中 1 バッグに抗 D による吸着解離試験陽性、DEL に典型的な RHD 遺伝子変異 (1,227G>A) が認められた。輸血後は検査データ上溶血を疑う所見はなく、また臨床からの副作用報告もなかった。

日本人では、Rh (D) 陰性者の約 10% が DEL とされており、今までも本症例と同様の報告例や、複数回 DEL 製剤が輸血された例が報告されている。Rh (D) 陰性製剤に DEL が含まれている可能性があることを再認識し、対策について検討する必要があると思われる。

キーワード：Rh (D) 陰性、抗 D、DEL、RHD 遺伝子

はじめに

Rh 血液型は、ABO 型に次いで臨床上重要である。特に D 抗原は免疫原性が強く Rh (D) 陰性者は、抗 D を産生しやすいとされている¹⁾²⁾。今回我々は、入院時の検査で Rh (D) 陰性、不規則抗体陰性と確認された患者に Rh (D) 陰性赤血球製剤を輸血後、抗 D を検出した症例を経験した。赤血球製剤の血液型精査および遺伝子解析により、DEL が含まれていたことが判明した。臨床経過と検査結果を報告する。

方 法

①輸血前検査・血液製剤検査

不規則抗体スクリーニングはカラム凝集法を用いた全自動機器 (オートビュー Innovo, オーツ) にて、LISS-IAT (low ionic strength saline-indirect antiglobulin test)、フィシン法 (2 段法) で実施した。不規則抗体同定検査は、パネル血球 (リゾルブパネル C, オーツ) を用いて試験管法で生理食塩液法、プロメリン法 (1 段法)、フィシン法 (2 段法)、PEG (polyethylene glycol)-IAT を施行した。

②抗 D 特異性の確認試験

1) 抗 G 確認の吸着解離試験³⁾⁴⁾

抗 D を含む患者血清を D-C+c-E-e+ 血球と 37°C で 30 分間反応させ、3,000rpm・5 分間遠心分離して吸着上清を採取した。血球沈渣は 5 回洗浄し、DT (dichlo-

romethane, dichloropropane) 解離を行った。次にその抗体解離液を D+C-c+E+e- 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。それぞれを用いて、PEG-IAT で抗体同定を行った。

2) 抗 LW との鑑別試験⁴⁾⁵⁾

PBS で洗浄した 3 種類のパネル血球 (D+K+, D+K-, D-K-) 1 容量に対して 4 容量の 0.2M DTT (dithiothreitol) (pH8.0) を加え、37°C で 30 分間反応させた。PBS で 4 回洗浄後、3% 血球浮遊液を作成した。患者血清と DTT 処理血球及び DTT 未処理血球を PEG-IAT で検査した。

③血液型精査

輸血した製剤の抗 D 吸着解離試験と RHD 遺伝子検査は、日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター (以下、血液センター) に依頼した。RHD 遺伝子検査は、Wagner F.F. らの文献⁶⁾ を参考に日本赤十字社中央血液研究所の小笠原らが開発した PCR-SSP (sequence-specific primer) と Real-time PCR を実施した。PCR-SSP にて、特異的検出部をそれぞれ D : RHD exon 10, d : RHD 欠損により生じる hybrid 型 Rhbox, DEL : RHD*01EL.01 (exon 9 に 1,227G>A をもつ) にプライマーを設定し、詳細は Table 1 の通りである。また、Real-time PCR による RHD exon 5 および DEL の SNP が存在する exon 9 を対象に RHD+/RHD- のタイピングを行った。

Table 1 PCR-SSP setting

Equipment: GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystem®)
PCR mixture 8.02 μ l
Breakdown
1 M Tris-HCl (pH 8.8): 0.473 μ l
1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ : 0.095 μ l
1 M MgCl ₂ : 0.009 μ l
2.5 mM dNTP: 0.076 μ l
DDW: 6.93 μ l
Primers
D: 0.057 μ l each
DCE10-F1: 5'-TGTAATGAGACATTTAGGCT-3'
D10-R1: 5'-TCAACTCCATTTTCTCTGACT-3'
263 bp
d: 0.071 μ l each
DNEG-F2: 5'-CGAAGGTTTCCAAACCCCAA-3'
DNEG-R2: 5'-TCTTTTCTGGCCTTAACATC-3'
1920 bp
DEL: 0.057 μ l each
DEL-F6: 5'-ATGACCAAGTTTTCTGGAAA-3'
DEL-R3: 5'-CAGCAAGTCAACATATGTACT-3'
102 bp
RHD & RHCE exon 8 (control): 0.014 μ l each
DCE8-F1: 5'-TACTGACACCGACAGTCCTT-3'
DCE8-R1: 5'-TGCTGTGTCTGGCAATGGT-3'
208 bp
DMSO: 2.5 μ l
DNA: 1 μ l (30 ng/ μ l)
Taq: Takara rTaq 0.08 μ l
PCR reaction condition
94°C (3 min.)
94°C (15 sec.)-59°C (30 sec.)-72°C (1 min.) 35 cycles
72°C (5 min.)

症例と経過

患者は79歳男性、心不全で近医通院中であったが、呼吸困難が出現、増悪し、当院に救急搬送された。来院時ヘモグロビン値が6.1g/dlであり、黒色便を認め眼球は黄染を示した。四肢には著明な浮腫を認め、右手第3・4指は化膿性関節炎の所見を示した。精査加療のため入院となった。

患者は脳梗塞の既往よりワルファリンを内服しており、搬送時PT-INRは4.02であり、貧血と黒色便は抗凝固作用亢進による消化管出血によるものと判断した。上部内視鏡検査にて多発性潰瘍性病変を認め、プロトンポンプインヒビター投与をし、赤血球製剤投与にて貧血の改善を図った。心臓超音波検査では左室駆出率28%で心不全を呈していた。血液検査上炎症反応を認め、右手第3・4指の化膿性関節炎に対して抗生剤投与を開始と手指の切断術施行となった(5病日)。

輸血と臨床データの推移を示す(Fig.1)。血液型はA型・Rh(D)陰性、C-c+E-e+、不規則抗体陰性、20歳代で虫垂炎手術時に輸血歴があるが、詳細は不明であった。1・2病日目でRh(D)陰性赤血球製剤が計5バッグ(8単位)輸血された。5病日にはカラム凝集法のLISS-IATおよびフィシン法で不規則抗体陽性となり、パネル血球による抗体同定検査にて抗Dが検出された。

この原因調査のため血液センターへ調査依頼をし、使用製剤中にDELが含まれていた(詳細は後述)。DELはC抗原を併せ持つことが多いと報告があり⁷⁾、第12病日以降は、Rh(D)陰性製剤かつC抗原陰性製剤を使用し対応した。

また、抗体価測定は、ディエゴA血球、D+C+c-E-e+型(オーソ)を用い、反応増強剤無添加のIATで5病日1倍、12病日8倍(PEG-IATで5病日2倍、

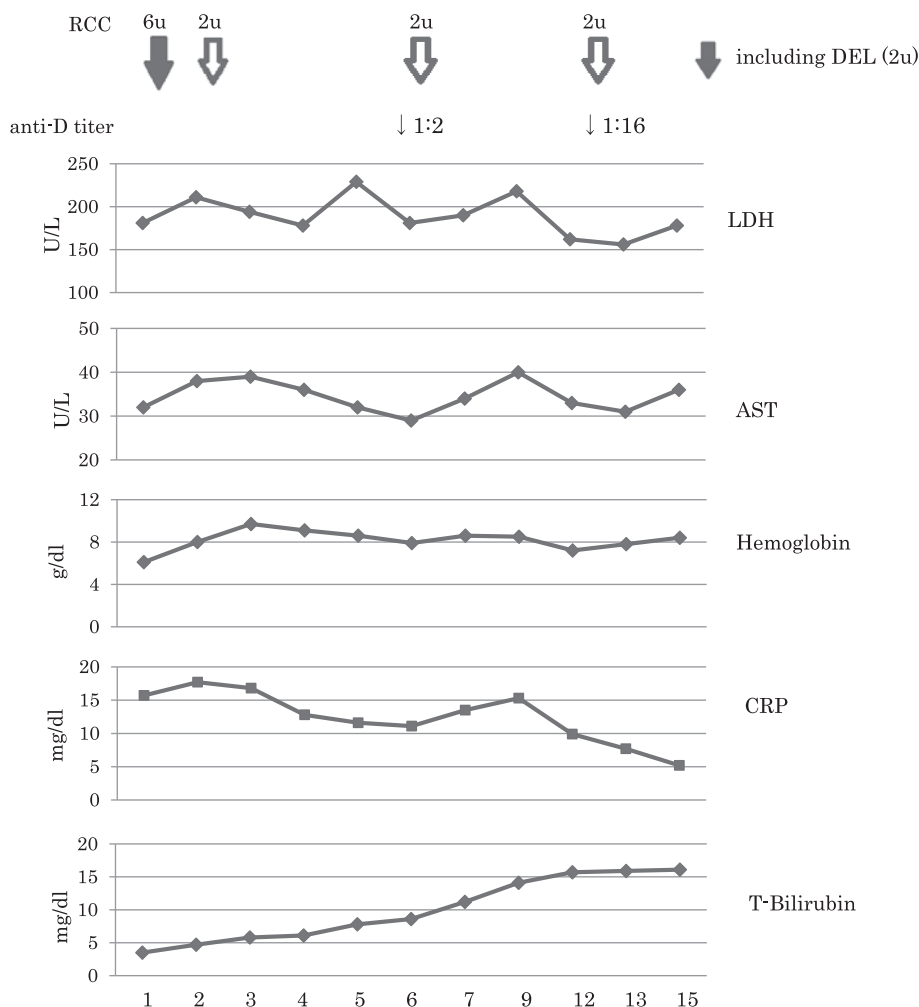


Fig. 1 Clinical data after transfusion

12 病日 16 倍) で推移した。DEL 製剤輸血後も AST や LDH の大きな上昇は認められなかった。5 病日目には LDH が上限をわずかに超えたが、LDH/AST を計算したところ 10 未満であり、溶血よりも手術による影響と考えられた。また、搬送時の血清ビリルビン (T-Bil) は 3.5mg/dl、直接型ビリルビン (D-Bil) 2.7mg/dl であり、入院後も直接型優位の著しい Bil. 上昇を認め、15 病日には T-Bil. 16.1mg/dl、D-Bil. 12.7mg/dl に至った。肝逸脱酵素、ALP や γ GTP はほぼ基準値内であった。画像検査では、うっ血肝の所見が認められた。加藤らの報告⁸⁾にあるように、感染に伴い高ビリルビン血症を呈することがあり、本症例では CRP の低下と共に、T-Bil. の上昇が落ち着いたことより (Fig. 1)、Bil. 上昇の一因にうっ血肝と感染が関与していたと考えた。また、データ上輸血後の溶血は否定的と考え、臨床からも輸血副作用報告がなかった。患者は 16 病日に転院となり、経過の詳細は不明であるが、11 日後に死亡した。

輸血学的精査

血液センターにて、使用製剤の抗 D 吸着解離試験および遺伝子解析が行われ、1・2 病日目に使用した赤血球製剤 5 バッグ中 1 バッグの血液型が DEL と判定された。抗 D 吸着解離試験陽性、さらに DEL に典型的な RHD 遺伝子 1,227 番塩基のグアニンからアデニンへの置換が認められた (Fig. 2)。また、他のバッグには Real-time PCR で RHD 遺伝子の混在は認めず、D 陰性の中に陽性分画がキメラとして混在している Rh (D) 陰性製剤の可能性は否定された。

患者血球の直接抗グロブリン試験は陰性で、DTT 解離試験を行ったが、解離液から抗体は検出されなかった。また、輸血前検体で行った抗 D 吸着解離試験は陰性で、患者自身が DEL である可能性は否定された。

パネル血球を用い試験管法にて不規則抗体同定を行い、結果は Fig. 3 に示す。同定結果からは抗 D が検出されたが、抗 C は否定しきれない抗体となり、更に抗体の反応性を検討した。抗 C および抗 D の反応パターンの 1 つに、抗 G の可能性があり、吸着解離試験にて

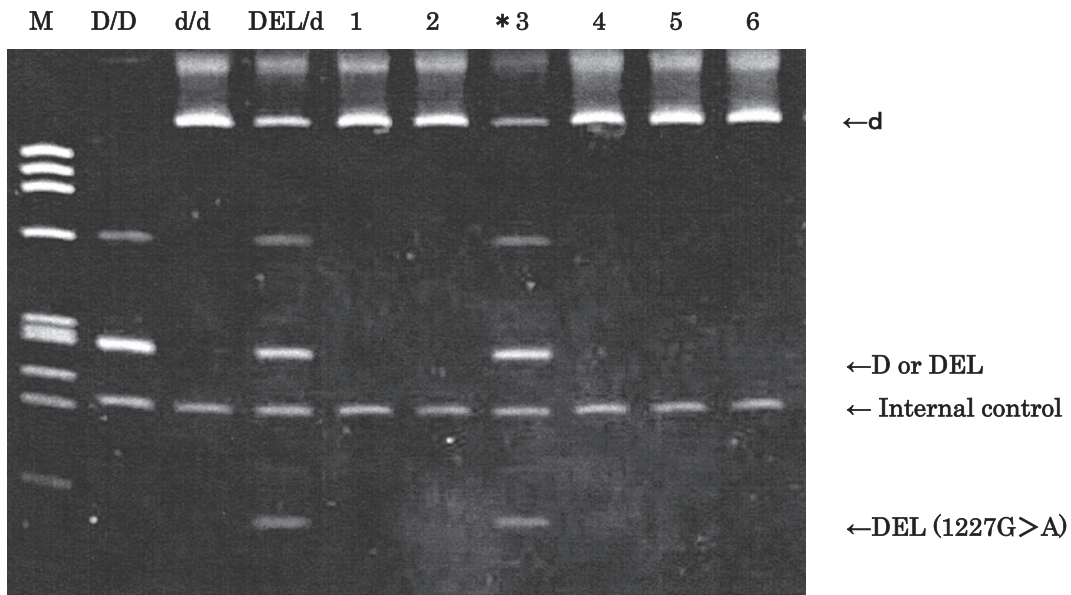


Fig. 2 PCR-SSP for RHD gene analysis

No. 1-No. 6 indicates transfused blood.

*No. 3 demonstrates DEL-specific pattern.

M: molecular marker, D/D: RhD-positive, d/d: RhD-negative, DEL/d: DEL

We transfused 5 bags of RCC (8u) until irregular autoantibody was detected on the 5th day, and one more bag (2u) was transfused on the 6th day. We asked the blood center to analyze all 6 bags.

Cell No.	Rh-hr					KELL		DUFFY		KIDD		Sex Linked	LEWIS			MNS				P	Test Results			
	D	C	E	e	e	K ₁	K ₂	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Xg ^a	Le ^a	Le ^b	S	s	M	N	P ₁	Sal.	Fic.	PEG-IAT		
1	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	2+	3+
2	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	2+	3+	
3	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	2+	3+	
4	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	+	0	2+	3+	
5	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	+	+	+	0	0	0	
6	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	
7	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	
8	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	
9	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	0	0	0	
10	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	0	
11	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	2+	2+	
自己 対照																					0	0	W+*	
Patient Cells	0	0	0	4+	4+																			

Fig. 3 Irregular antibody identification with an antigram

* weak reaction positive, and finally negative

検証した。結果、解離液および上清の抗体検査から抗G、抗Cは認めなかった。また、抗D様の特異性を示す抗LWの鑑別のため、DTT処理したD陽性血球との反応を確認し、反応が消失せず抗LWは否定された (Table 2)。以上の事から本症例の抗体は抗Dであることが確認された。

更に、今回の症例で抗D陽性化の原因となったDEL赤血球製剤のドナーの献血歴について、情報を収集した。このドナーは11回献血し、計11バッグが供給され、全てがRh陰性の患者に輸血されていた。各施設から血液センターには輸血副作用、特に溶血副作用に関する報告は届いていなかった。

Table 2 Exclusion of other antibodies

	1st time: reaction with D-C+c-E-e+	2nd time: reaction with D+C-c+E+e- (using 1st time supernatant)
supernatant antibody dissociated solution	anti-D antibody detected ND	ND ND

* This result shows the absence of anti-G antibody confirmed by an adsorption-elution test.

DTT treatment	-			+		
Panel cell	D+K+cell	D+K-cell	D-K-cell	D+K+cell	D+K-cell	D-K-cell
patient's serum	2+	2+	0	2+	2+	0
anti-K reagent	2+	0	0	0	0	0

* This result shows the absence of anti-LW antibody by reactions after DTT treatment.

考 察

DEL は, RHD 遺伝子の変異などの理由で赤血球膜の RhD 蛋白アミノ酸変異を認め, 現在 21 タイプが確認されている¹⁾. また, 弱い D 抗原を有し, 日本での頻度は Rh (D) 陰性者の約 10% とされている. 輸血のドナーとしては Rh (D) 陰性として扱われており, DEL 赤血球製剤輸血後に抗 D 産生を認めた症例が報告されている. 日本では 2005 年の佐久間らの報告⁴⁾をはじめとし, 他に, 少なくとも 3 例が学会や講演にて発表されている. また, 2 度の DEL 赤血球輸血とその感作により著明な抗 D 抗体価の上昇を認めた症例⁹⁾や Wagner ら¹⁰⁾や Kim ら¹¹⁾は DEL 製剤輸血後に 1 次免疫応答で抗 D が産生され得ることを報告している. 幸いにも, これらのうち明らかに溶血が問題となった症例はない.

今回我々も同様の症例を経験し, 患者に輸血歴があること, さらに抗 D が輸血後早期に検出されたことから, 抗 D は二次免疫応答によって産生されたものと推測した.

諸外国では, D 陰性患者へ輸血による D 抗原感作を防ぐため, 前向きな取り組みや調査が報告されている¹²⁾¹³⁾. 一方, weakD のような抗原量の少ない赤血球が D 陰性患者へ輸血後に免疫応答を引き起こす可能性について, 極めて低いとの報告もある¹⁴⁾¹⁵⁾. しかし, DEL 製剤が Rh (D) 陰性者へ複数回輸血される可能性や患者が将来妊娠する可能性を考えると, 可能な限り抗体産生を回避する姿勢は必要ではないだろうか.

DEL は D-C+c+E-e+, D-C+c-E-e+, D-C+c+E+e+ の Rh 表現型に多く検出され³⁾, C 抗原陽性が多いことから, Rh (D) 陰性者に対して同時に C 抗原陰性製剤の選択をすることは対策の一つであり, 特に Rh (D) 陰性若年女性などでは, 製剤選択に十分考慮すべきと考える.

著者の COI 開示: 本論文発表内容に関連して特に申告なし.

謝辞: RHD 遺伝子検査および抗 D 吸着解離試験に協力してく

ださった日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センターに深謝いたします.

文 献

- 1) 谷 慶彦, 高橋順子: Rh 血液型. 編者 日本輸血・細胞治療学会認定医制度審議会カリキュラム委員会, 新版 日本輸血・細胞治療学会 認定医制度指定カリキュラム, 日本輸血・細胞治療学会, 東京, 2012, 80—83.
- 2) Yazer MH, Triulzi DJ: Detection of anti-D in D-recipients transfused with D+ red blood cells. *Transfusion*, 47: 2192—2201, 2007.
- 3) 蒲池正次編: 新輸血検査の実際 初版, 日本臨床衛生検査技師会, 東京, 2011, 43—54.
- 4) 佐久間志津枝, 伊藤佳代, 鈴木隆幸, 他: RhD 陰性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. *日本輸血学会誌*, 51: 585—588, 2005.
- 5) Brecher EM eds: Technical manual 14th edition, 50th anniversary AABB edition 1953—2003, American Association of Blood Banks, Maryland, 2002, 703—704.
- 6) Wagner FF, Flegel WA: RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*, 95: 3662—3668, 2000.
- 7) Fukumori Y, Hori Y, Ohnoki S, et al: Further analysis of Del (D-elute) using polymerase chain reaction (PCR) with RHD gene-specific primers. *Transfus Med*, 7: 227—231, 1997.
- 8) 加藤悠太郎, 菊池 潔, 露木 晃: 術後約 1 年にわたり高ビリルビン血症が遷延した大腸穿孔の 1 例. *日本腹部救急医学会雑誌*, 29 (5): 773—776, 2009.
- 9) 佐久間香枝, 久保紀子, 西村加世, 他: Del 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. *日本輸血学会誌*, 56: 381—385, 2010.
- 10) Wagner T, Kormoczi GF, Buchta C, et al: Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*, 45: 520—526, 2005.

- 11) Kim KH, KIM KE, Woo KS, et al: Primary anti-D immunization by DEL red blood cells. *Korean J Lab Med*, 29 (04): 361—365, 2009.
- 12) Scott AS, Nagl L, Tilley L, et al: The RHD (1227G > A) DEL-associated allele is the most prevalent DEL allele in Australian D-blood donors with C+ and/or E+ phenotypes. *Transfusion*, 54: 2931—2940, 2014.
- 13) Flegel AW, von Zabern I, Wagner FF: Six years' experience performing RHD genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion*, 49: 465—471, 2009.
- 14) Kumpel B: Are weak D RBCs really Immunogenic? *TRANSFUSION*, 46: 1061—1062, 2006; reply offered by Dr. Flegel 63-64.
- 15) Frohn C, Dümbgen L, Brand JM, et al: Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. *Transfusion*, 43: 893—898, 2003.

ANTI-D ANTIBODY DETECTION AFTER TRANSFUSION OF RhD-NEGATIVE RBCs IN AN RhD-NEGATIVE RECIPIENT

Kiyoko Kobayashi, Shinji Matsumoto, Mizuki Arai, Yasuka Watanabe, Mai Maeda, Takashi Tanazawa, Sachiko Fukunaga, Mitsue Hirayama and Kenji Ikebuchi

Division of Cell Transplantation and Transfusion, Saitama Medical University International Medical Center

Abstract:

We experienced a case in which anti-D antibody was detected in an RhD-negative recipient after RBC transfusion of RhD-negative units. A total of 8 units from 5 donors was transfused. All units were analyzed by the anti-D dissociative-adsorption test and by PCR-SSP for the RhD gene at Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross. In one unit, a mutation was found on the 1,227 base, which is typical in DEL. There was no obvious evidence of hemolysis or other adverse effects in the lab data and clinical course after transfusion.

DEL is classified as RhD-negative based on serological testing, despite the presence of weak D antigen. Several cases about one or two transfusions of DEL to an RhD-negative recipient have been reported so far.

This case suggests that DEL is classified as RhD-negative blood units and may produce anti-D antibody in an RhD-negative recipient after transfusion. Therefore, it is necessary to discuss how to prevent the transfusion of DEL to RhD-negative recipients.

Keywords:

RhD-negative, Anti-D antibody, DEL, RHD gene