

## RhD 陽性成分採血血小板, 新鮮凍結血漿輸血後に抗 D を検出した RhD 陰性の 1 例

田中 一人 金子 なつき 小山内 崇将 久米田 麻衣 阿島 光  
玉井 佳子 伊藤 悦朗

RhD 陽性成分採血由来の血小板および新鮮凍結血漿輸血後に抗 D を検出した RhD 陰性症例を経験した。患者は輸血時 48 歳 (抗 D 検出 51 歳) の男性である。輸血前の不規則抗体検査は陰性で、手術中・後に RhD 陰性 Ir-RCC-LR-2 2 袋, RhD 陽性 FFP-LR-Ap 2 袋, RhD 陽性 Ir-PC-LR-10 2 袋が輸血された。術後経過は順調で術後 15 日で軽快退院した。輸血 1,349 日後, 再手術予定時の不規則抗体検査で抗 D が検出された。抗体価は 8 倍であり 1,734 日後も 8 倍を維持していた。抗体産生の原因は, 成分採血由来血液製剤に含まれる微量の赤血球と考えられた。輸血された RCC 2 袋はいずれも Rh フェノタイプに Ce を保有しないため, Del 型の可能性は低いと考えられた。抗体産生時期が不明のため, 一次免疫応答か二次免疫応答によるものかは明らかにできなかったが, 成分採血由来血液製剤中の微量赤血球であっても抗体産生を誘発するのに十分な免疫原性を有していると考えられた。本症例の経験から我々は, RhD 陰性患者が同種血輸血を受けた場合は輸血 1~4 カ月後に不規則抗体スクリーニング検査を実施することを推奨している。

キーワード: RhD 不適合輸血, 抗 D 産生, 輸血後不規則抗体検査

## はじめに

本邦の成分採血血小板製剤 (apheresis platelets ; APs) に含まれる赤血球液は 10 $\mu$ l (0.01ml) 以下であり, 不規則抗体産生のリスクは少ないと考えられていた<sup>1)</sup>が, 輸血後に不規則抗体 (抗 E, 抗 c, 抗 Jk<sup>b</sup>) を認めた症例が報告されている<sup>2)~4)</sup>。

厚生労働省「輸血療法の実施に関する指針」(平成 26 年 11 月一部改正)<sup>5)</sup>では, 「患者が RhD 陰性で将来妊娠の可能性のある患者に RhD 陽性の APs を用いた場合には, 抗 D 免疫グロブリンの投与により抗 D 抗体の産生を予防できることがある」と記載されているが, 本邦では静注用抗 D 免疫グロブリンが販売されていないこと, 保険適応がないこと, RhD 同種免疫頻度<sup>6)~8)</sup>が不明であること, 等の理由により一律な対応がされていない。

今回, RhD 陽性 APs および成分採血新鮮凍結血漿 (fresh frozen plasma, leukocytes reduced, apheresis ; FFP-LR-Ap) 輸血後に抗 D を認めた RhD 陰性の 1 例を経験したので詳細を報告するとともに, 現在の本院での RhD 陰性患者への同種血輸血後の対応について報告する。

## 症 例

抗 D 初検出時 50 代 (RhD 異型輸血 3 年後) の男性, O 型, RhD 陰性, ccEe. 19 歳のときに他院にて大動脈二尖弁に対する弁形成術 (輸血の詳細は不明) が施行された。2009 年 11 月頃から労作時の前胸部圧迫感が頻回となり当院循環器内科の精査にて大動脈弁狭窄症, 狭心症と診断された。術前の不規則抗体スクリーニング検査は陰性であり, 2010 年 2 月, 胸部心臓血管外科で, 大動脈弁置換術, 冠動脈バイパス術 (1 枝) が施行された。出血量は 1,616ml, 輸血は自己血 : 希釈式 1,200 ml, 回収式 520ml, 同種血 : 照射赤血球濃厚液-LR-2 (irradiated red cells concentrates- leukocytes reduced ; Ir-RCC-LR-2) 2 袋, FFP-LR-Ap 2 袋, 照射濃厚血小板-LR-10 (irradiated platelet concentrate, leukocytes reduced ; Ir-PC-LR-10) 2 袋で, このうち FFP および PC の計 4 袋が RhD 陽性であった。術後経過が良好であったため, 不規則抗体検査が実施されないまま術後 15 日で軽快退院した。

2013 年 4 月, 術後経過観察目的の造影 CT 検査で上行大動脈仮性動脈瘤を指摘され, 手術適応と診断された。術前の不規則抗体スクリーニング検査は間接抗グロブリン試験陽性で, 抗 D が同定された。同年 11 月上行大動脈部分弓部置換術が施行された。出血量は 1,335

ml, 輸血は自己血：希釈式 800ml, 回収式 700ml, 同種血：FFP-LR480 2袋, Ir-PC-LR-10 1袋であった。抗 D 保有のため同種血は全て RhD 陰性血で対応した。

## 使用試薬と検査方法

### 1. 輸血前検査

血液型検査はマイクロタイピングシステム ABD カード (mono) を用い全自動輸血検査装置 ID-GelStation (BIO・RAD) で行った。D 陰性確認試験は抗 D 血清 (抗 D ポリクローナル抗体 (ヒト), オースクリニカル・ダイアグノスティックス), ヒト由来抗 D モノクローナル抗体 (抗 D モノクロ「三光」, エーディア) を用い, 間接抗グロブリン試験を実施した。Rh フェノタイプはバイオクローン抗 C, 抗 c, 抗 E, 抗 e (オースクリニカル・ダイアグノスティックス) を用いて行った。不規則抗体検査 (スクリーニング・特異性同定・抗体価測定) は, マイクロタイピングシステム IgG カードを用い, 全自動輸血検査装置および用手による LISS-IAT (low ionic strength saline-indirect antiglobulin test) により行った。不規則抗体検査用血球試薬は, DiaCell II, DiaCell Dia+, DiaPanel (BIO・RAD) を用いた。

直接抗グロブリン試験はクームス血清バイオクローン, 抗ヒト IgG 血清, バイオクローン抗 C3d (オースクリニカル・ダイアグノスティックス) を用い, 試験管法で行った。

### 2. 抗 D 特異性の確認試験

#### 1) 抗 C, 抗 G の確認<sup>9)10)</sup>

2種類血球 (Ccee および DccEE) を用い吸着解離試験を行った (二重吸着解離試験)。

Ccee 血球と患者血清を 37°C 60 分反応 (吸着) 後, 遠心分離し吸着上清を採取した。血球沈査は DiaCidel (BIO・RAD) を用いて抗体解離を行った。さらに, その抗体解離液を DccEE 血球を用いて同様に操作し, 吸着上清および抗体解離液を得た。それぞれの吸着上清および抗体解離液を用い抗体同定を行った。

#### 2) Mimicking 抗体の確認

患者血清を DccEE 血球, ccee 血球それぞれを用いて同様に吸着・解離を行い, 抗体同定を行った。

3) 抗 LW の鑑別 (DTT (dithiothreitol) 処理血球との反応性)<sup>11)</sup>

PBS で洗浄したパネル赤血球 1 容量に対し, 0.2M DTT (pH8.0) 4 容量を加え, 37°C 30 分間反応させた。DTT 処理血球を 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 (polyethylene glycol)-IAT により実施した。対照には抗 K 試薬を用いた。

### 3. 輸血された血液製剤の Rh フェノタイプ検査及び RHD 遺伝子型

輸血製剤の Rh フェノタイプ及び RHD 遺伝子型は, 東北ブロック血液センターから情報提供を受けた。

## 結 果

### 1. 血液型, 不規則抗体検査, 直接抗グロブリン試験

本症例の血液型は, O 型, RhD 陰性, ccEe であった。2010 年 2 月の輸血から 3 年 9 月 (1,349 日) 後の 2013 年 11 月に実施した不規則抗体スクリーニング検査で LISS-IAT 陽性となり, 特異性同定検査の結果, 抗 D と同定された。抗体価は DccEE 血球に対し 8 倍, 4 年 9 月 (1,734 日) 後の検査でも DccEE 血球に対し 8 倍であった (図 1)。直接抗グロブリン試験はいずれの時期も陰性であった。

### 2. 抗 C, 抗 G, Mimicking 抗体の確認, 抗 LW の鑑別

パネル血球の反応から抗 D が同定されたが, 抗 C および抗 G は否定できないため 2 種類の血球を用い, 吸着解離試験を行った。その結果抗 D 以外は認められなかった (表 1)。また, 患者血清は DccEE 血球で吸着されるが, ccee 血球では吸着されないことから Mimicking 抗体は否定された (表 1)。また, DTT 処理血球との反応では RhD 特異性を認めたため, 抗 LW の可能性は否定された (表 2)。

### 3. 輸血された血液製剤の Rh フェノタイプ及び RHD 遺伝子型 (表 3)

2010 年 2 月の手術時に輸血された Ir-RCC-LR-2 2 袋は RhD 陰性, Rh フェノタイプはそれぞれ ccEE (RHD 遺伝子型 *d/d*), ccEe (RHD 遺伝子型未検査), FFP-LR-Ap 2 袋は RhD 陽性, とともに DCCee, Ir-PC-LR-10 2 袋は RhD 陽性, とともに DCcEe であった。

### 4. 臨床経過

症例の臨床経過を示す (図 1)。

輸血後の Hb 値は安定し, 血清総ビリルビン値の変動を認めず, 溶血性輸血副作用を示唆する所見は認められなかった。周術期以外の同種血輸血はなかった。

## 考 察

RhD 陰性患者に対する輸血は原則として RhD 陰性血を使用するが, FFP および PC に関しては供給調整がつかない場合 RhD 陽性血が使用されることがある。輸血業務・輸血製剤年間使用量に関する総合的調査<sup>12)</sup>によると 2010 年から 2013 年までの 4 年間で RhD 陰性患者に対する RhD 陽性血小板輸血は 624 例施行されている。厚生労働省「輸血療法の実施に関する指針」(平成 26 年 11 月一部改正)<sup>5)</sup>では, 「患者が RhD 陰性で将来妊娠の可能性のある患者に血小板輸血を行う場合には, 出

不規則抗体	未検出	抗D	抗D	抗D
抗体価		8	8	8
直接抗グロブリン試験		(-)	(-)	(-)
輸血製剤				
	↓ ↓ Ir-RCC-LR-2 D(-)			
	↓ ↓ FFP-LR-Ap D(+)		↓ ↓ FFP-LR480 D(-)	
	↓ ↓ Ir-PC-LR-10 D(+)		↓ Ir-PC-LR-10 D(-)	

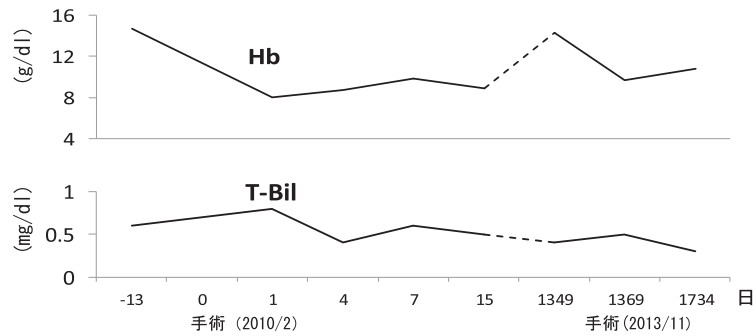


図1 臨床経過

表1 吸着解離試験

	検体	吸着赤血球 Rh フェノタイプ	抗体特異性	
			吸着上清	解離液
抗 C, 抗 G 確認	患者血清	Ccee	抗 D	未検出 ※
	解離液 ※	DccEE	未検出	未検出
Mimicking 抗体確認	患者血清	DccEE	未検出	抗 D
		ccee	抗 D	未検出

表2 DTT 処理血球との反応性

パネル 赤血球	未処理		処理	
	患者血清	抗 K 試薬	患者血清	抗 K 試薬
D+ K+	2+	3+	2+	0
D+ K-	2+	0	2+	0
D- K+	0	3+	0	0
D- K-	0	0	0	0

表3 輸血製剤の Rh フェノタイプ及び RHD 遺伝子型

製剤名	Rh フェノタイプ	RHD 遺伝子型
Ir-RCC-LR-2	ccEE	d/d
Ir-RCC-LR-2	ccEe	未検査
FFP-LR-Ap	DCCee	
FFP-LR-Ap	DCCee	
Ir-PC-LR-10	DCcEe	
Ir-PC-LR-10	DCcEe	

来るだけ RhD 陰性由来のものを用いる」と記載されているにも関わらず、624 例中 44 例が 50 歳以下の女性であった。本症例は、RhD 陰性 PC の調整困難と連絡を受けた際に、成人男性であることから RhD 陽性血の使用に大きな躊躇は無かった。本院では 2012 年 4 月から 2015 年 3 月までの 3 年間に供給調整がつかずに 11 袋の RhD 陽性 APs が RhD 陰性患者に使用された<sup>13)</sup>。

RhD 陰性患者に RhD 陽性血小板製剤(全血由来及び APs)が輸血された場合の抗 D 産生率は海外では 1.44% と報告されている<sup>14)</sup>が、本邦における頻度を検討した報告はほとんどない。APs に含まれる赤血球は 10μl 以下<sup>1)</sup>であり、同種一次免疫に必要な赤血球量とされる 30~50μl<sup>15)</sup>より少ないため RhD 不適合 APs 輸血による抗 D

産生は少ないと想定されているが、輸血後に不規則抗体が産生された症例報告が散見される<sup>2)~4)</sup>。今回の我々の症例も含め、APs 輸血による不規則抗体産生リスクの検討が今後は重要であると思われる。

今回抗 D が産生された免疫刺激の要因としては、Del 型赤血球を考慮する必要がある<sup>16)~18)</sup>。日本人の RhD 陰性の約 10% に見出されており Rh フェノタイプ Ce と極めて強い相関を持つことが報告されている<sup>18)19)</sup>。本症例に輸血された RCC は 1 袋が ccEE(遺伝子型が d/d)、1 袋が ccEe(遺伝子型未検査)であることから Del 型の可能性は極めて低いと考えられた。以上より、本症例は RhD 陽性 APs ならびに FFP が輸血されている



ことから、成分採血血液製剤に混在する赤血球が抗 D 産生の原因となったと推測された。

遅発性溶血性輸血副作用 (delayed HTR : DHTR) は、妊娠・同種血輸血等により産生された不規則抗体が、対応抗原陽性の赤血球と反応して溶血反応を起こす現象である。輸血後 24 時間以降 (多くは数日後から十数日後) に生じる。DHTR の原因は、不規則抗体保有既往のある患者に対して、対応抗原陽性血が輸血された場合、二次免疫応答によって急激に抗体価が上昇し、輸血された抗原陽性血を溶血させるものがほとんどであり、初回の非自己赤血球抗原曝露による一次免疫応答によって産生された抗体が原因となることは稀であり、本邦でも症例報告<sup>20)21)</sup>が散見されるのみである。一次免疫応答による DHTR は、①溶血所見・症状の出現が遅い (輸血後 20 日以降が多い)、②発症早期に IgM クラスの抗体が検出される等の特徴がある。Lozano<sup>15)</sup>は一次免疫応答による抗体は最初の輸血から 4 週以上経過してから検出されるとしている。

本症例は術後経過が良好であったため、不規則抗体検査が実施されないまま輸血後 15 日で軽快退院し、その後の経過は観察されていなかった。抗 D 保有が判明したのは輸血後 1,349 日目であり、その間の抗 D 抗体価の変遷は不明であるため、本症例の抗 D が一次免疫応答によるものか二次免疫応答によるものかは確定できなかった。しかし、抗体価は輸血後 1,734 日経過時点でも 8 倍を維持していることから、APs に含まれる微量の赤血球であっても抗体産生を誘発するのに十分な免疫原性を有していると考えられた。同種赤血球曝露既往者に対する再度の同種血輸血に際しては、不規則抗体スクリーニング検査結果を慎重に判断するとともに、輸血後の不規則抗体検査の推移ならびに DHTR 出現の有無に関して十分な留意が必要である。

同種血輸血後の不規則抗体検査について言及した論文はほとんどないが、RhD 不適合輸血後の抗 D 産生の有無の確認については、抗 D 産生による潜在的なリスクを考慮し、輸血後 4 週間目には最低限その確認を行うことが望ましい<sup>1)</sup>とされている。しかし、周術期の輸血では術後経過が良好な場合、不規則抗体検査が実施されないことが多いのが実状である。不規則抗体産生を適正に発見することは将来生じうる DHTR の防止に重要であり、適切な時期<sup>22)</sup>における輸血後の不規則抗体検査が重要であると考えられた。残念ながら同種血輸血患者全例に輸血後不規則抗体検査を施行することは不可能であるため、本院では RhD 陰性患者に同種血輸血を施行した際の輸血後不規則抗体スクリーニング検査の推奨を開始している。RhD 陰性患者に対する輸血後不規則抗体検査で抗 D が検出された症例に対しては、主治医・輸血部門ならびに患者と情報を共有する。そ

の後の同種赤血球輸血時には Del 型赤血球が輸血されることが無いように Rh フェノタイプに Ce を保有しない赤血球製剤を血液センターに依頼する、妊娠時には嚴重な経過観察を主治医に依頼する等の対策を立案している。今後、症例の蓄積により同種免疫による不規則抗体の詳細が明らかになることが望まれる。

#### 本院での RhD 陰性患者に対する輸血後検査の実際

【目的】同種血輸血による抗 D 産生の有無を適正に把握し、将来生じうる二次免疫応答の危険性の有無を明らかにする。

【方法】RhD 陰性患者が同種血輸血を受けた場合は、溶血性副作用の有無にかかわらず、輸血実施 1~4 カ月後に不規則抗体スクリーニング検査を実施するように主治医に依頼する。

【結果】2014 年 1 月~2016 年 12 年まで、19 名の RhD 陰性患者が同種血輸血を受けた。うち 11 例で輸血後不規則抗体スクリーニング検査が施行され、抗 D 産生者は認めていない。

#### 結 語

RhD 不適合 APs, FFP-LR-AP 輸血後に抗 D を検出した RhD 陰性の 1 例を経験した。本院では、本症例の経験を踏まえて、RhD 陰性患者が同種血輸血を受けた場合は、溶血所見の有無にかかわらず輸血 1~4 カ月後に不規則抗体検査を実施することを推奨して主治医と連携を取っている。

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：本論文作成にあたり、Rh フェノタイプ及び RHD 遺伝子型情報を提供して頂きました東北ブロック血液センターに深謝いたします。

本論文の内容の一部は、第 106 回日本輸血・細胞治療学会東北支部例会 (2015 年、福島) において発表した。

#### 文 献

- 1) 藤井康彦：RhD 陰性患者への血小板輸血、輸血副反応ガイド、2014、88—90.
- 2) Kitazawa J, Nollet K, Morioka H, et al: Non-D Rh antibodies appearing after apheresis platelet transfusion: stimulation by red cells or microparticles? Vox Sang. 100: 395—400, 2011.
- 3) 吉居真由, 山口恭子, 池松陽子, 他：血小板製剤輸血後に不規則抗体が検出された 2 症例. 日本輸血細胞治療学会誌, 57 : 465—469, 2011.
- 4) 金 錦麗, 岡部雅一, 大宮章子, 他：血小板輸血により抗 E を産生した 1 症例. 日本輸血細胞治療学会誌, 62 : 740—744, 2016.

- 5) 厚生労働省医薬食品局血液対策課：輸血療法の実施に関する指針（平成26年11月一部改正）。
- 6) Weinstein R, Simard A, Ferschke J, et al: Prospective surveillance of D-recipients of D+ apheresis platelets: alloimmunization against D is not detected. *Transfusion*, 55: 1327—1330, 2015.
- 7) O'Brien KL, Haspel RL, Uhl L, et al: Anti-D alloimmunization after D-incompatible platelet transfusions: a 14-year single-institution retrospective review. *Transfusion*, 54: 650—654, 2014.
- 8) Bartley AN, Carpenter JB, Berg MP: D+ Platelet transfusions in D-patients: cause for concern? *Immunohematology*, 25: 5—8, 2009.
- 9) AABB Technical Manual 18th edition, 2014, 328.
- 10) Bio-Rad ID-News, Vol.60, 2014.
- 11) AABB Technical Manual 18th edition, Method, 2014, 3—18.
- 12) 日本輸血細胞治療学会ホームページ：輸血業務・輸血製剤年間使用量に関する総合的調査（2016年8月現在）  
[http://yuketsu.jstmct.or.jp/medical/medicine\\_and\\_medical\\_information/comprehensive\\_investigation/](http://yuketsu.jstmct.or.jp/medical/medicine_and_medical_information/comprehensive_investigation/)
- 13) 山形和史, 田中一人, 久米田麻衣, 他：東北ブロック血液センター需給管理前後における当院のRhD陰性適合血小板製剤の供給状況. *日本輸血細胞治療学会誌*, 62: 498—499, 2016.
- 14) Cid J, Lozano M, Ziman A, et al: Low incidence of anti-D alloimmunization following D+ platelet transfusion: The Anti-D Alloimmunization after D-incompatible Platelet Transfusions (ADAPT) study. *Br J Haematol*, 168: 598—603, 2015.
- 15) Lozano M, Cid J: The clinical implications of platelet transfusions associated with ABO or Rh(D) incompatibility. *Transfus Med Rev*, 17: 57—68, 2003.
- 16) 小林清子, 松本慎二, 新井瑞紀, 他：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. *日本輸血細胞治療学会誌*, 61: 416—421, 2015.
- 17) 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. *日本輸血細胞治療学会誌*, 56: 381—385, 2010.
- 18) 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.
- 19) Fukumori Y, Hori Y, Ohnoki S, et al: Further analysis of D<sub>e</sub>(D-elute) using polymerase chain reaction(PCR) with *RHD* gene-specific primers. *Transfusion Med*, 7: 227—231, 1997.
- 20) 石丸 健, 天満智佳, 藤原義一, 他：一次免疫応答より惹起されたと考えられる遅発性溶血性輸血副作用の1症例. *日本輸血学会雑誌*, 50: 768—773, 2004.
- 21) 北澤淳一, 猪股真喜子, 鎌田千鶴, 他：一次免疫反応により産生された抗C+e抗体による遅発性溶血性輸血副作用を呈した1例. *日本輸血学会雑誌*, 51: 594—600, 2005.
- 22) Stack G, Tormey CA: Detection rate of blood group alloimmunization based on real-world testing practices and kinetics of antibody induction and evanescence. *Transfusion*, 56: 2662—2667, 2016.

## ANTI-D DETECTED IN RhD-NEGATIVE RECIPIENT AFTER TRANSFUSION OF RhD-POSITIVE APHERESIS PLATELETS AND FRESH FROZEN PLASMA

*Kazuto Tanaka, Natsuki Kaneko, Takayuki Osanai, Mai Kumeta, Hikaru Ajima, Yoshiko Tamai and Etsuro Ito*

Division of Transfusion Medicine, Hirosaki University Hospital

### **Abstract:**

Anti-D was detected in a 51-year-old RhD-negative recipient after transfusion of RhD-positive apheresis platelets (APs) and apheresis fresh frozen plasma (FFP).

Unexpected red cell antibodies were not detected during a cardiovascular operation in February, 2010. Two units of RhD-negative red cell concentrates (RCC) of RhCe-negative phenotype were also transfused during the surgery. He had no hemolytic episodes in the perioperative period.

When he was referred to our hospital for the re-operation in November, 2013, we detected anti-D at a titer of 8 by LISS-IAT. We hypothesized that residual red blood cells contained in the APs/FFP might have caused a primary or secondary immune response to produce anti-D antibodies.

This case suggests the need to examine unexpected red cell antibodies 1 to 4 months after allogenic transfusion to an RhD-negative recipient.

### **Keywords:**

RhD-mismatch transfusion, anti-D alloimmunization, unexpected red cell antibody screening after transfusion

---

©2017 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://yuketsu.jstmct.or.jp/>