

自己の I 抗原が一過性に検出されず診断に苦慮した自己抗 I 陽性の寒冷凝集素症

石山 和樹¹⁾ 中山 享之¹⁾²⁾ 丹羽 玲子¹⁾ 小園 愛弓¹⁾ 藤田 江美¹⁾
 松尾 友仁¹⁾ 安藤 高宣¹⁾ 高 四強¹⁾ 林 恵美¹⁾ 片井 明子¹⁾
 加藤 静帆³⁾ 田中 光信⁴⁾ 高橋 順子⁵⁾ 加藤 栄史¹⁾

患者は70歳代の男性，O型RhD陽性，輸血歴は無し．術前検査にて溶血性貧血を指摘された(2014年)．直接抗グロブリン試験は抗IgG及び抗補体ともに陽性．不規則抗体スクリーニングは自己対照及びスクリーニング用赤血球試薬の全てが陽性であった．O型新生児赤血球とは反応せず自己抗Iと同定した．4℃での寒冷凝集素価は1:16,384以上，反応温度域は4℃～30℃であった．赤血球製剤の輸血が必要になり，交差適合試験は間接抗グロブリン試験で完全溶血を認めた．Ii抗原検査では患者赤血球は抗Iモノクローナル抗体と反応せず，I抗原が検出されなかった．I抗原を決定するGCNT2の遺伝子解析を2016年に実施し，変異のないGCNT2*01型であった．2017年にIi抗原検査を再度試みたところI抗原およびi抗原が検出された．寒冷凝集素価は1:1,024に低下していた．I血液型特異性を示す寒冷凝集素を検出したが，I抗原が検出されず，慎重な検査結果の判断が必要となったが，I抗原およびi抗原と貧血を経過観察することが有効と考えられた．

キーワード：寒冷凝集素症，自己抗I，Ii抗原，GCNT2

はじめに

Ii血液型は，国際輸血学会認証血液型システムにおいて27番目に登録されている¹⁾．胎生期ならびに生後直後はi型であり，β1, 6-GlcNAc転移酵素がi抗原にGlcNAcを付加しI抗原が形成され，生後約18カ月でI型になる²⁾．β1, 6-GlcNAc転移酵素をコードする遺伝子領域は，GCNT2におけるExon1C, 2, 3であり，これらに変異や欠損を認めるアレルを有すると成人になってもi型のままであると報告されている^{3)~5)}．また日本人成人の99.99%以上がI型であり，I抗原陰性(i型)は0.01%未満とされている⁶⁾．

寒冷凝集素は，主にIi血液型に特異性を示す冷式自己抗体(自己抗I)である．健常者でも微量に検出され病的意義は無いが，4℃での寒冷凝集素価が512倍または512倍未満でも30℃以上で凝集活性がある場合は病的意義がある⁷⁾．なお，自己抗Iは酵素処理赤血球を用いると未処理赤血球に比べ反応性が増大する⁸⁾．また，抗Iには稀な成人i型の人がもつ同種抗Iも存在する⁹⁾．

今回我々は，溶血性貧血を呈する患者から自己抗I

を同定したが，赤血球表面のI抗原が一過性に検出されず，その後i抗原が検出され，貧血の改善と共に陰性化した症例を経験したので報告する．

症 例

70歳代の男性．O型RhD陽性．輸血歴は無し．以前から寒冷になると血尿や貧血症状があり，40歳代に他院で原因不明の溶血性貧血と診断されていた．2014年10月に胸部不快感で当院を受診し，発作性上室性頻拍と診断された．血液検査で貧血と溶血所見を認め血液内科紹介となり，精査を行った．

検査方法

血清分離

EDTA-2K入り及び無添加採血管で採血した末梢血を採血直後から40℃で保温し，同様に保温したバケツで遠心分離後，血漿及び血清を直ちに分離した．

直接抗グロブリン試験 (DAT)

40℃に加温したリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で患

- 1) 愛知医科大学病院輸血部
- 2) 愛知医科大学病院中央臨床検査部
- 3) 日本赤十字社東海北陸ブロック血液センター
- 4) 日本赤十字社近畿ブロック血液センター
- 5) 元日本赤十字社近畿ブロック血液センター

〔受付日：2021年2月18日，受理日：2021年5月17日〕

者赤血球を3回洗浄した後、抗グロブリン試薬を添加し混和後、遠心判定を行った。なお、抗グロブリン試薬は多特異性（抗IgG、抗C3b・C3d）、抗IgG、抗C3b・C3d、抗C3d、抗IgA、抗IgM、対照としてPBSを用いた。

不規則抗体スクリーニング

試験管法にて生理食塩液法（生食法）とポリエチレングリコール添加間接抗グロブリン試験（PEG-IAT）を一般的な方法で実施した。血漿中の寒冷凝集素の除去には、寒冷凝集素吸収試薬（ウサギ赤血球ストローマ由来）を用い、吸着除去した血漿で生食法とPEG-IATを実施した。また、血漿に等量の0.01M-Dithiothreitol（DTT）を混和させ37℃、30分間加温させDTT処理した血漿と、対照として等量のPBSを加えた血漿（DTT未処理血漿）を用いてPEG-IATを実施し、不規則抗体におけるIgMとIgGの鑑別を行った。

寒冷凝集素検査

検査手順を図1-Aに示した。患者血清を7%ウシアルブミン液で2倍連続希釈した。特異性を調べるため、患者とABO同型の成人赤血球（OI）と生後4日以内の新生児赤血球（Oi）、Ficin酵素処理したOI（Ficin処理OI）の3種の赤血球を用意した。なお、Ficin処理はリゾルブ[®]パネルC付属のStabilized ficin solution（Ortho）を使用した。各希釈血清にOIを加えた系列を4つ作製し、4つの異なる温度（4、22、30及び37℃）でそれぞれ15分間反応させた。1,000g、15秒間遠心後、1+以上の凝集を示す最大希釈倍数を各温度での寒冷凝集素価とし、1+以上で凝集する温度範囲を反応温度域とした。Oi及びFicin処理OIについても、OIと同様に実施した。

Donath-Landsteiner（DL）test

患者血清250μlに健常者血清250μlと50%赤血球浮遊液50μlを加え、以下の3条件で反応させた。条件1）0℃にて30分間反応後、37℃にて60分間反応、条件2）0℃にて90分間反応、条件3）37℃にて90分間反応。陰性対照は、健常者血清500μlと50%赤血球浮遊液50μlを加え条件1）で実施した。3条件の反応後は、1,000g、15秒間遠心後、溶血の有無を判定した。

ii 抗原検査

抗Iはヒト由来IgMモノクローナル抗体（OSK14、日本赤十字社製）、抗iはヒト由来IgMモノクローナル抗体（OSK28、日本赤十字社製）を用いた。患者赤血球を40℃加温PBSで3回洗浄した。I抗原検査は、抗Iモノクローナル抗体と3%赤血球浮遊液を混和させ、20℃、20分間反応させた。i抗原検査は、抗iモノクローナル抗体と3%赤血球浮遊液を混和させ、0.5%ブロメリン液を加え混和後、4℃、20分間反応させた。両検査の反応後は3,000rpm、30秒間で遠心判定した。

GCNT2 解析

使用したプライマーの一覧を図1-Bに示した。末梢血から抽出したgenomic DNAをテンプレートとして、GCNT2のExon1C、2、3領域をPCR法にて増幅した。直接DNAシーケンス法にてPCR産物の塩基配列を解析した。なお、本検査は主治医より患者へ説明と同意書を取得し、院内倫理委員会の承認を得た。

結 果

DAT

多特異性：3+、抗IgG：陰性、抗C3b・C3d：3+、抗C3d：3+、抗IgA：1+、抗IgM：1+、対照：陰性となり、陽性であった。

不規則抗体スクリーニング（表1）

PEG-IATにおいて、寒冷凝集素未吸収血漿では完全溶血を認め、寒冷凝集素吸収後の血漿では陰性であった。DTT未処理血漿では部分溶血を認め、DTT処理血漿では陰性となりIgMと判定した。

寒冷凝集素検査（表2）

2014年11月では、OIでの寒冷凝集素価（4℃）は1：16,384以上であった。30℃での凝集活性を認め、反応温度域は4℃～30℃であった。Ficin処理OIでは寒冷凝集素価は上昇し、反応温度域が37℃まで拡大した。Oiとは反応せず、I血液型特異性を示す自己抗Iと同定した。2016年以降は、寒冷凝集素価は低下し、反応温度域も縮小した。

DL test

陰性対照を含め、すべて陰性であった。

ii 抗原検査（表3）

2014年11月では、患者赤血球は抗Iモノクローナル抗体と反応せずI抗原が検出されなかった。2017年では3+となりI抗原が検出された。2018年では陽性対照のOIと同等の4+であった。抗iモノクローナル抗体に対する反応は、2014年11月では弱く（w+）反応し、2017年1月は1+、3月は2+と増強したが、2018年8月には陰性化した。

GCNT2 解析

2016年1月に実施し、Exon 1C、2、3領域に変異を認めず、GCNT2*01型（I型）であった。

臨床経過（図2）

2014年：10月に血液検査で溶血性貧血所見（Hb 5.8g/dl、T-BIL 4.21mg/dl、I-BIL 4.04mg/dl、LD 558U/l、ハプトグロビン 10mg/dl未満）を指摘された。血清蛋白分画にてMピークあり、免疫電気泳動にてIgM-κ型M蛋白を認めた。患者は慢性特発性CADと診断された。翌月にステロイド投与しつつ、赤血球製剤を4単位輸血した。なお、製剤はABO、Rh、Duffy、Kidd、Diego、S血液型が同型を選択し、交差適合試験はPEG-

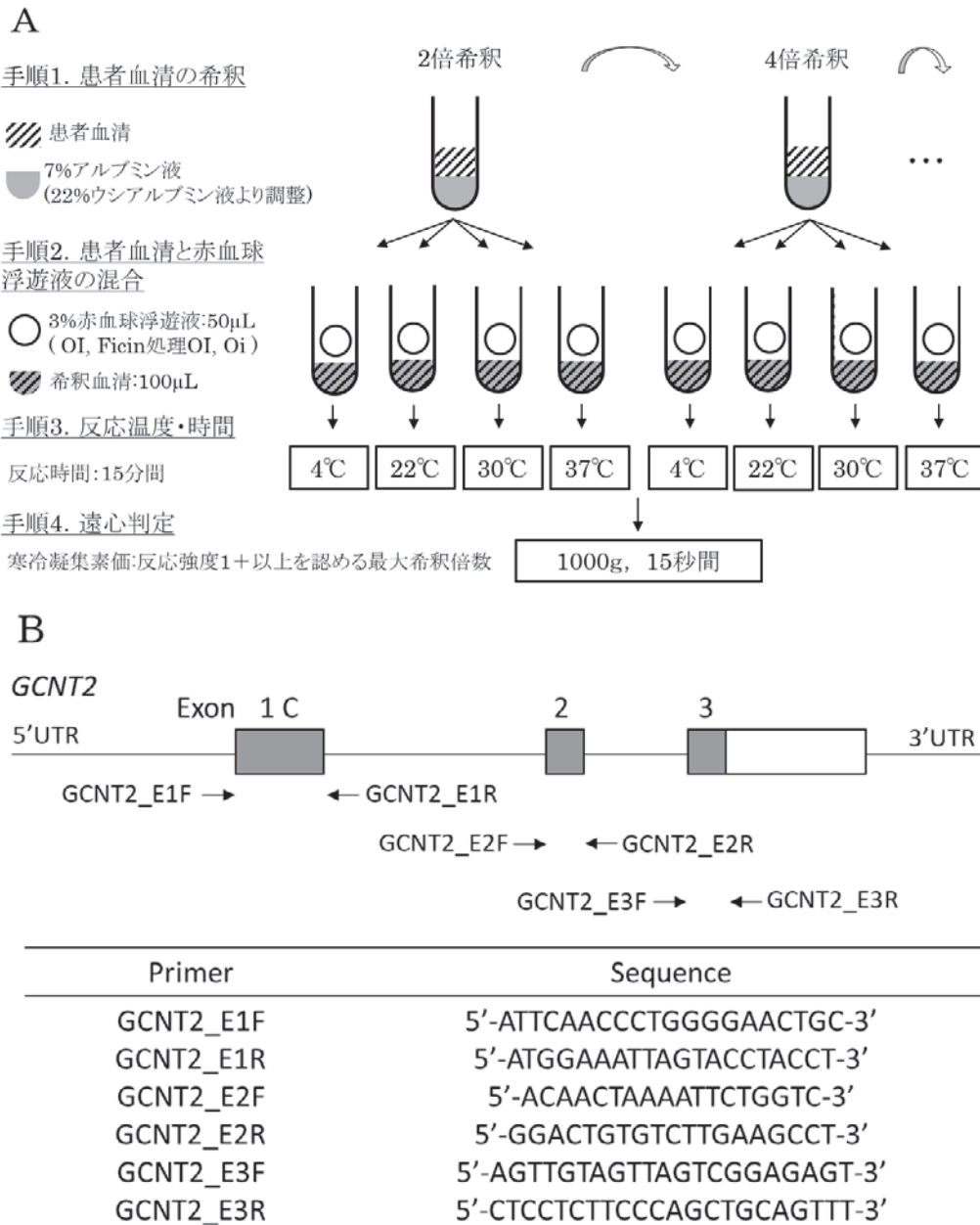


図1 検査手順・方法

A: 寒冷凝集素価測定方法. 7%ウシアルブミンを用いて患者血清を2倍連続希釈した(手順1). 各赤血球(OI, Ficin処理OI, Oi)を3%浮遊液に調整し, 各希釈血清と混合した系列を4組ずつ作製した(手順2). 各組は, 4つの反応温度(4, 22, 30, および37 $^{\circ}$ C)で15分間反応させた(手順3). 遠心後, 1+以上の凝集を示す最大希釈倍数をそれぞれの赤血球に対する寒冷凝集素価とした(手順4).

B: GCNT2解析に用いたプライマーの設定部位と塩基配列. GCNT2の5'非翻訳領域, イントロンのスプライシングサイトを含むエクソン1C, 2, 3領域をPCR法で増幅した(上図). 使用したプライマー配列を下図に示す.

IATで完全溶血を認めた. 輸血副反応は無く, Hbは9.1g/dlに上昇し, その後2016年にかけては7g/dl台を推移した.

2017年9月:腰痛のため撮影したMRI・CT検査で腹部リンパ節腫大を指摘された. 生検を施行し, B細胞性の悪性リンパ腫が確認され, R-COP療法を開始した.

2018年5月以降:リツキシマブ単剤投与にて経過観

察中である. 溶血性貧血も改善している.

考 察

本症例は初回検査(2014年)に患者赤血球のI抗原が陰性を示し, その後GCNT2解析によりI型を確認, 経過観察したIi抗原検査で患者赤血球のI抗原を確認した. 初回検査でI抗原が陰性を示した原因は不明であっ

表1 不規則抗体スクリーニング結果

2014年11月	生食法		PEG-IAT			
	寒冷凝集素		寒冷凝集素		DTT	
	未吸収	吸収	未吸収	吸収	未処理	処理
赤血球						
Cell No. 1	2+	1+	H	0	PH	0
2	2+	1+	H	0	PH	0
3	2+	1+	H	0	PH	0
自己対照	2+	1+	H	0	PH	0

H: 完全溶血 PH: 部分溶血

表2 寒冷凝集素検査結果

採血日	赤血球	反応温度			
		4℃	22℃	30℃	37℃
2014年11月	OI	>1:16,384	1:64	1:2	<1:1
	Ficin 処理 OI	>1:16,384	1:8,192	1:512	1:64
	Oi (新生児血)	<1:2	<1:1	<1:1	<1:1
2016年1月	OI	1:1,024	1:128	1:4	<1:2
	Ficin 処理 OI	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	Oi (新生児血)	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
2017年12月	OI	1:2,048	1:4	<1:1	<1:1
	Ficin 処理 OI	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	Oi (新生児血)	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
2018年2月	OI	1:1,024	<1:1	<1:1	<1:1
	Ficin 処理 OI	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	Oi (新生児血)	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.

N.T.: Not Tested

表3 Ii 抗原検査結果

ヒト由来 モノクローナル抗体	採血日 赤血球	2014年	2017年		2018年
		11月	1月	3月	8月
抗I (OSK14)	患者	0	1+	3+	4+
	陽性対照 (OI)	4+	4+	4+	4+
	陰性対照 (Oi)	0	0	0	0
抗i (OSK28)	患者	w+	1+	2+	0
	陽性対照 (OI)	3+	3+	3+	3+
	陰性対照 (Oi)	0	0	0	0

たが、推測として、①患者赤血球に感作した寒冷凝集素により抗Iモノクローナル抗体の反応が阻害された、②I抗原の減弱が考えられた。①については、患者赤血球に感作した自己抗体は血液型検査を妨害する報告¹⁰⁾があり、確認のため、患者血清中の自己抗IをOI赤血球に感作させた後、I抗原検査を同様の手順で試みたが、抗Iモノクローナル抗体との反応は阻害されず、否定的であった。②については、血液疾患によるABH抗原減弱の報告¹¹⁾や、フローサイトメトリー法により血液疾患によるI抗原の減弱を確認した報告¹²⁾がある。本症例では、M蛋白が検出された初回検査時から悪性リンパ腫が潜在していた可能性が考えられ、貧血および網状赤血球の増加に伴い、一過性にI抗原が陰性化し、i抗原

を検出した可能性が推察された。その後、貧血の改善および網状赤血球の正常化により、i抗原が消失した。

その他には、赤血球膜上のKell系¹³⁾やKidd系¹⁴⁾抗原が一時的に陰性化した例が報告されており、前者は微生物由来の因子が原因とされ、後者は否定的で原因不明であった。双方は血漿中の自己抗体あるいは高頻度抗原に対する抗体の消失に伴い自己の抗原が検出された。本症例では、細菌感染による可能性は低く、寒冷凝集素価の低下を認めた後にI抗原が検出された点において類似していた。

I血液型特異性を示す反応温度域の広い高力価の寒冷凝集素を検出した。本症例ではI抗原が一過性に検出されず、慎重な検査と製剤選択が必要になった。寒冷凝

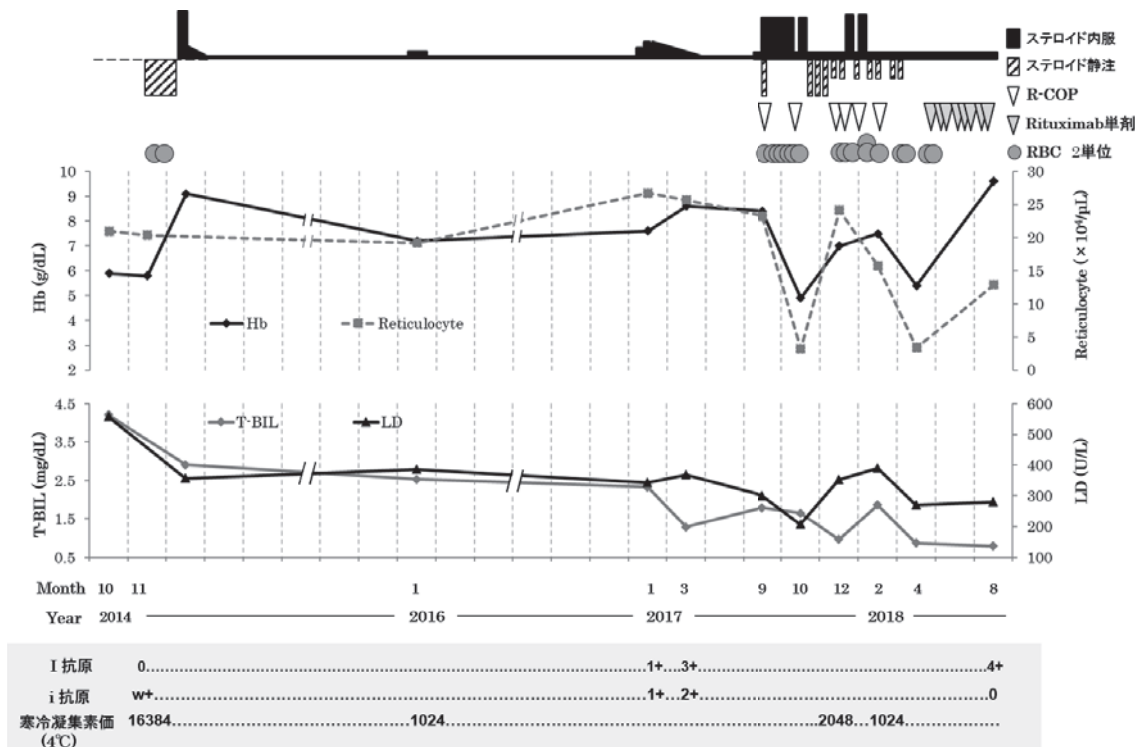


図2 臨床経過

2014年初診時から約4年間の治療歴、輸血歴、血液検査（Hb、Reticulocyte、T-BIL、LD）所見の推移を示す。診断時よりステロイドが開始となったが、反応性は乏しかった。2017年9月に悪性リンパ腫が確認され、R-COP（リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニン）療法（計6コース）とリツキシマブ維持療法が施行された。それに伴いT-BIL、LDの低下、Hbの上昇を認めた。

集素検査やIi抗原の検索と貧血を経過観察することが有効と考えられた。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文献

- 1) ISBT home page: Working party Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology. <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/> (2021/4 accessed).
- 2) Marsh W. L.: Anti-i: a cold antibody defining the Ii relationship in human red cells. *Br J Haematol*, 7: 200—209, 1961.
- 3) Onodera T.: A new IGNT allele found in the adult i-negative in Japanese without congenital cataracts. *Vox Sang*, 262, 2011.
- 4) Ogata H., Okubo Y., Akabane T.: Phenotype i associated with congenital cataract in Japanese. *Transfusion*, 19: 166—168, 1979.
- 5) Borck G., Kakar N., Hoch J., et al: An Alu repeat-mediated genomic GCNT2 deletion underlies congenital cataracts and adult i blood group. *Hum Genet*, 131: 209—216, 2012.
- 6) 永尾暢夫：【広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査〔第7版〕その数値をどう読むか】免疫学的検査 血液型および輸血検査 概論 血液型の種類と日本人の基本的表現型. *日本臨床*, 68: 721—727, 2010.
- 7) 金倉 譲, 亀崎豊美, 梶井英治, 他：自己免疫性溶血性貧血 診療の参照ガイド(平成28年度改訂版), 9-15, 特発性造血障害に関する調査研究班, 自己免疫性溶血性貧血. http://zoketsushogaihan.com/file/guideline_H28/07.pdf (2021年4月現在).
- 8) Fung M. K., Grossman B. J., Hillyer C. D., et al: AABB TECHNICAL MANUAL, 18TH EDITION, In: Fung M. K., Grossman B. J., Hillyer C. D., eds, TECHNICAL MANUAL, 18TH EDITION. 18, 2014, 306—309.
- 9) Yamaguchi H., Okubo Y., Tomita T., et al: A Rare i (I-negative) Phenotype Blood Found in Japanese Families. *Proceedings of the Japan Academy*, 46: 889—892, 1970.

- 10) Zhu J. Y., Lan J. C., Hu L. Y., et al: [Study on blood ABO typing in patients with autoimmune hemolytic anemia]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 12: 525—527, 2004.
- 11) Bianco T., Farmer B. J., Sage R. E., et al: Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies. *Blood*, 97: 3633—3639, 2001.
- 12) Sato H, Yasue S, Utsumi M, et al: DECREASED I ANTIGEN EXPRESSION IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES WITH REDUCED RED CELL A AND B ANTIGENS: POSSIBILITY OF BLOOD GROUP DIFFERENTIATION WITH FLOW CYTOMETRY. *Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy*, 59: 457—461, 2013.
- 13) Vengelen-Tyler V., Gonzalez B., Garratty G., et al: Acquired loss of red cell Kell antigens. *Br J Haematol*, 65: 231—234, 1987.
- 14) Issitt P. D., Obarski G., Hartnett P. L., et al: Temporary suppression of Kidd system antigen expression accompanied by transient production of anti-Jk3. *Transfusion*, 30: 46—50, 1990.

A CASE OF HARD-TO-DIAGNOSIS COLD AGGLUTININ DISEASE WITH AUTO ANTI-I DUE TO TRANSIENTLY UNDETECTABLE I-ANTIGEN ON THE PATIENT'S RED BLOOD CELLS

Kazuki Ishiyama¹⁾, Takayuki Nakayama¹⁾²⁾, Reiko Niwa¹⁾, Ayumi Kozono¹⁾, Emi Fujita¹⁾, Tomohito Matsuo¹⁾, Takanori Ando¹⁾, Siqiang Gao¹⁾, Megumi Hayashi¹⁾, Akiko Katai¹⁾, Shizuho Kato³⁾, Mitsunobu Tanaka⁴⁾, Junko Takahashi⁵⁾ and Hidefumi Kato¹⁾

¹⁾Department of Transfusion Medicine, Aichi Medical University Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory, Aichi Medical University Hospital

³⁾Japanese Red Cross Tokai-Hokuriku Block Blood Center

⁴⁾Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

⁵⁾Former Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

Abstract:

A man in his 70s was referred for further examination because a preoperative laboratory screen showed hemolytic anemia (2014). His blood type was O, Rh positive and he had no history of transfusion. Direct antiglobulin tests were positive. The polyethylene glycol-potentiated indirect antiglobulin test (PEG-IAT) showed that the patient's serum reacted with adult O-type red blood cells (RBCs), but not neonatal RBCs, suggesting that cold agglutinin was caused by auto anti-I. The titer was greater than 1:16,384 at 4°C, and activity remained at 30°C. He required transfusion of 4 units (two bags) of RBCs, and a cross-match test using PEG-IAT showed hemolysis. Auto anti-I was detected. Interestingly, however, the patient's RBCs did not react with an anti-I IgM monoclonal antibody (mAb). Analysis of the patient's DNA showed no mutation in *GCNT2*. The patient's RBCs became reactive towards anti-I IgM mAb (2017). Thus, examination of I-antigen, i-antigen, and anemia were effective for diagnosing cold agglutinin in this patient.

Keywords:

Cold agglutinin disease, Auto anti-I, Ii-antigen, *GCNT2*