Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, Vol. 70. No. 4　70（4）：502―508, 2024

【症例報告】　Case Report

母親由来抗 E による新生児溶血性疾患に対する IgG サブクラス解析

蓮沼　秀和[1)]　石田　智子[1)]　大滝　皓生[1)]　岩下　洋一[1)]　町田　　保[1)]
中尾三四郎[2)]　野中みづき[3)]　鈴木沙耶香[4)]　高島　明子[3)]　川瀬　泰浩[4)]
清水　直美[1)2)]

不規則抗体による胎児新生児溶血性疾患（Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn：HDFN）では抗体価とIgG サブクラスの違いにより重症度は異なる．今回当院では抗 E：128 倍の妊婦より出生した児について，遅発性に溶血性貧血が進行し，生後 11 日目に赤血球輸血が施行され一度は Hb 値の改善を認めたものの 51 日目までに再び貧血が進行した症例を経験した．本症例について母児の IgG サブクラス解析と単球貪食試験，輸血後の児の赤血球量を経時的に測定し病態との関係について検討を行った．

解析結果から母児共に IgG1 型の抗 E が検出され，単球の貪食率については低値を示していた．輸血直後の児の赤血球量は全体の約 28% まで低下していたが，51 日目では約 50% まで増加していた．

本症例において遅発性に溶血が進行した理由として，IgG1 型の抗 E であり単球の貪食率が低値であった事が考えられた．また輸血後に再度貧血を生じたのは産生された児の赤血球に対し残存していた抗 E が反応した事などが考えられた．

高力価 IgG1 型の抗体による HDFN では長期的な経過観察の必要性があり，不規則抗体の IgG サブクラス解析はHDFN の病態推察の一助となる可能性が示唆された．

キーワード：不規則抗体，胎児新生児溶血性疾患，IgG サブクラス，フローサイトメトリー，単球貪食試験

はじめに

不規則抗体による胎児新生児溶血性疾患（Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn：HDFN）は抗体の種類，力価，IgG サブクラスの違いにより重症度が異なる[1)~3)]．今回我々は母親由来の抗 E が児に移行した後，遅発性に溶血性貧血が進行した症例を経験し，Flow Cytometer（FCM）を用いた IgG サブクラス解析および単球貪食試験（Monocyte Monolayer Assay：MMA），更に児の輸血後赤血球残存量の解析を行い，貧血との関係について検討を行ったので報告する．なお残余検体を用いた解析については当院倫理委員会承諾の下，患者同意を得て実施した（承認番号 S23027）．

症　例

40 代女性，G2P1，輸血・移植歴無し．血液型は A 型 R_1R_1（DCCee），他院より妊娠 29 週 6 日で抗 E の抗体価が 16 倍まで上昇したため当院を紹介受診された．以後 E＋ヘテロ赤血球を用いた用手法による反応増強剤無添加間接抗グロブリン試験[4)]で抗体価を実施，経過中に胎児超音波検査で中大脳動脈血流速度の上昇や形態的異常は認められなかったものの妊娠 38 週 0 日で抗体価が 128 倍まで上昇したため，翌日に帝王切開が施行された．

児は 2,538g の女児，Apgar score は 1 分値 7 点，5 分値 8 点．血液型は A 型 R_1R_2（DCcEe）であった．出生時，T-Bil：3.9mg/*l*，Hb：14.2g/d*l* と重篤な溶血所見は認めず，直接抗グロブリン試験（DAT）陽性（広範囲：4＋，抗 IgG：4＋，抗 C3d：陰性，対照：陰性），児の血漿中抗 E 抗体価 16 倍かつ児の赤血球抗体解離試験にて抗 E を認めたため当院 NICU に即日入院となった．その後，黄疸と共に徐々に貧血が進行，光線療法により T-Bil の改善を認めるも day11 に Hb：7.1g/d*l*

1）東邦大学医療センター佐倉病院輸血部
2）東邦大学医療センター佐倉病院血液内科
3）東邦大学医療センター佐倉病院産婦人科
4）東邦大学医療センター佐倉病院小児科
連絡責任者：清水　直美，E-mail：naomi.shimizu@med.toho-u.ac.jp
〔受付日：2023 年 12 月 14 日，受理日：2024 年 6 月 8 日〕

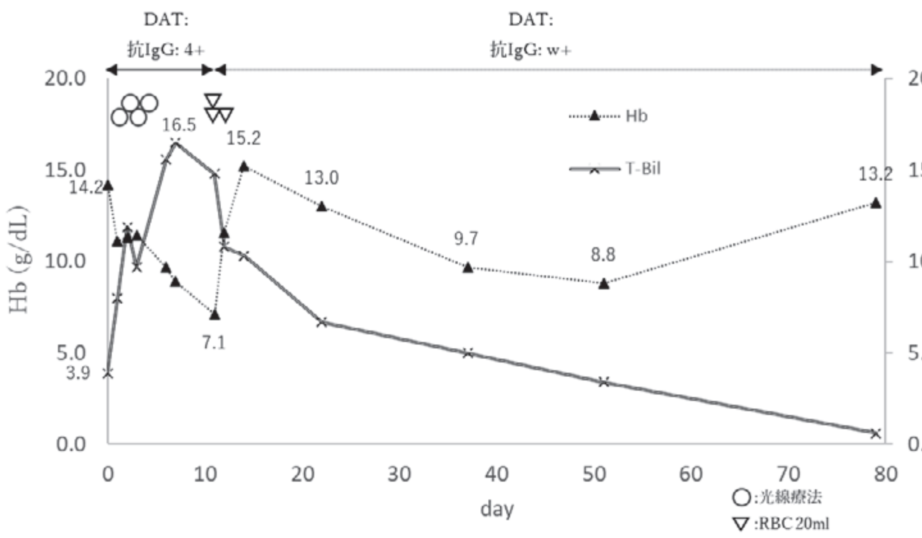


Fig. 1　児の臨床経過

まで低下，分割したIr-RBC-LR-1（A型 R_1R_1）20m*l* が２日間にわたり計３回投与された．輸血直後にはHb：15.2g/d*l* まで改善し退院．day51の外来フォローで再びHb：8.8g/d*l* まで低下が認められたものの，RBC投与を行うことなくday79にはHb：13.2g/d*l* まで自然軽快，以後貧血の進行は認められなかった（Fig. 1）．

方　　法

①母親および児血漿中抗EのIgGサブクラス解析

血漿100µ*l* に対して約1%に調整した R_1R_1，R_2R_2（DccEE）の赤血球10µ*l*，ポリエチレングリコール溶液（PEG．富士フイルム和光純薬株式会社）100µ*l* を添加し37℃で15分加温．4回洗浄後，100倍希釈したSheep Anti-Human IgG1～IgG4 pAb-FITC（Binding Site社）を50µ*l* ずつ添加．室温15分間反応後，FACS Verse（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）にて蛍光強度を測定，IgG1～IgG4における R_2R_2/R_1R_1 の蛍光強度値を測定しS/N比2.0以上を特異性ありとした．

②児の赤血球に結合した抗EのIgGサブクラス解析

児赤血球を1%に調整後，各10µ*l* を4回洗浄．上記①のIgGサブクラスの試薬およびPBSを50µ*l* ずつ添加したのち上記と同様に反応させた．PBSを添加した児の赤血球の蛍光強度値を陰性対照（Negative Control：N.C）とし，各IgGサブクラスの蛍光強度値に対するS/N比を算出した．

③MMA

筆者らが以前報告[5]した操作法にならいMMAを実施した．母児の血漿を用いた貪食率の測定についてはPKH67色素溶液（Green Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma-Aldrich社）で標識した R_2R_2 赤血球浮遊液を調製し，それぞれ血漿50µ*l* とPEG100µ*l* を添加，37℃で15分間加温後，IgG感作赤血球を調製した．なお児の赤血球を用いた貪食率の検討については既に母親由来のIgG1型抗Eが感作されているためPKH67色素溶液で染色したものを使用した．

次いで健常人の血液から分離した単核球のRPMI1640浮遊液をIgG感作赤血球と混和，CO_2 インキュベーター内で37℃，1時間培養した．溶血操作の後，PE/Cy7-抗CD14（PE/Cyanine7 anti-human CD14 Antibody, Biolegend社）を用いて単球の染色を行い，X軸にPE/Cy7（CD14）を，Y軸にFITC（PKH67）を展開させ両者が陽性となった領域を貪食率として解析した．

④輸血後の児の赤血球量解析

児の赤血球表面上には抗Eの感作が起きているため，c抗原量を解析する事とした．児および R_1R_1，R_2R_2 の赤血球を洗浄後にADVIA™120RBC/PLT希釈液（SIEMENS Healthineers株式会社）で固定，約1%に調整．赤血球10µ*l* とモノクローナル抗cワコー（富士フイルム和光純薬株式会社）50µ*l* を4℃で30分反応．洗浄後，（×100）Anti-IgM pAb-FITC（MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO.）50µ*l* で染色し，R_1R_1 および R_2R_2 赤血球の分布が99%以上となる領域を陰性・陽性域として児赤血球の割合を解析した．

結　　果

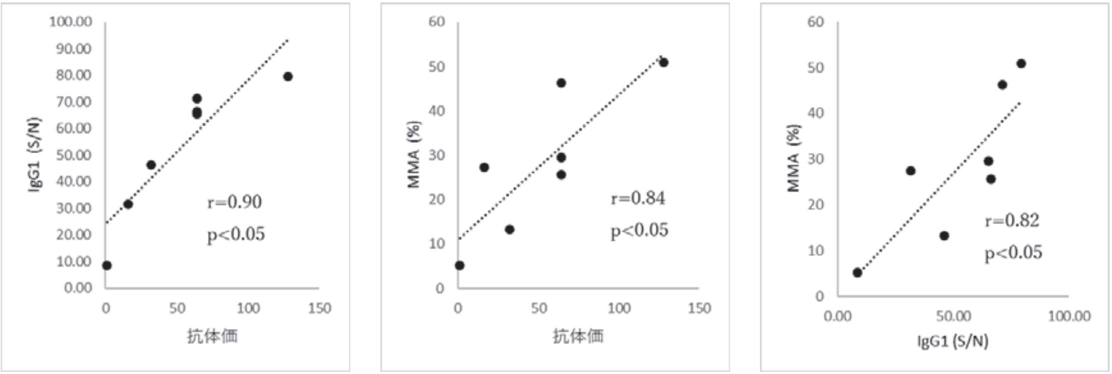
①母親および児血漿中抗EのIgGサブクラス解析

経過中の母親および児の結果をTable 1に示す．IgGサブクラスの結果から，母児ともにIgG1型の抗Eが検出され，母親血漿の抗体価が上がるにつれFCM解析でもIgG1値の増加が認められた．母親血漿のIgG1は出産直前（38週0日）が最も高い値（IgG1：S/N=79.61）を検出し，出生時の児の値はIgG1：S/N=31.69と母親

Table 1 母親および児血漿中の抗 E 抗体価，IgG サブクラス，MMA 解析結果

	週数および出生日数	抗体価	IgG サブクラス（S/N）				MMA（%）
			IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	
母親血漿	23 週 6 日	2	−	−	−	−	−
	27 週 6 日	16	−	−	−	−	−
	29 週 6 日	32	46.29	1.29	1.26	1.30	13.33
	34 週 0 日	64	65.30	1.09	1.04	1.07	29.61
	36 週 0 日	64	66.29	1.02	1.02	1.03	25.65
	38 週 0 日	128	79.61	1.02	1.08	1.00	50.90
	産後翌日	64	71.31	1.06	1.12	1.00	46.34
児血漿	day0	16	31.69	1.00	0.86	0.86	27.39
	day51	1	8.54	1.12	1.12	1.02	5.11

−は他施設での抗体価のため未実施



（a）抗体価とIgG1　（b）抗体価とMMA　（c）IgG1とMMA

Fig. 2 母児血漿における抗体価・IgG1・MMA の相関

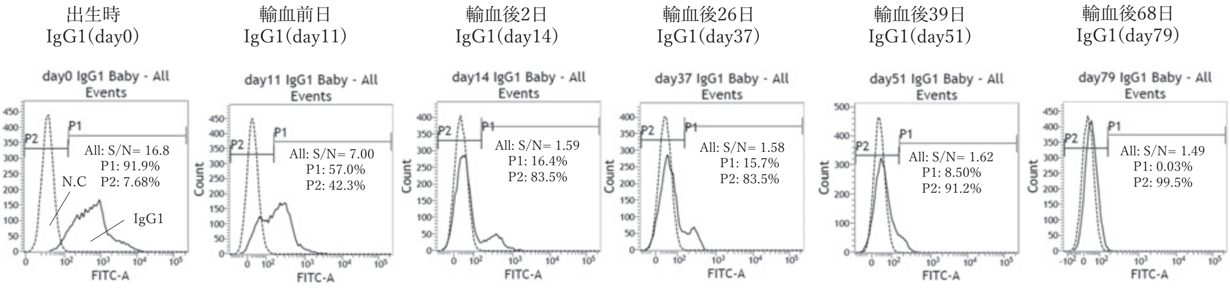


Fig. 3 児赤血球に結合している抗 E の抗 IgG1 を用いた FCM 解析

の値に比べて約 4 割程度が血漿中に検出された．また児の経過において，day51 においても児の血漿中には抗体価・IgG1 値のいずれも出生時より低下が認められるが，IgG1 型の抗 E が検出されている．

本症例ではこれら母児の血漿を用いた抗体価と IgG サブクラス解析（IgG1 値）について高い相関（r=0.90, p＜0.05）が得られた（Fig. 2）．

②児の赤血球に結合した抗 E の IgG サブクラス

児赤血球についても IgG1 型の抗 E が検出され，解析したヒストグラムパターンを Fig. 3 に，IgG1 と MMA，Hb 値との推移を Fig. 4 に示す．IgG1 感作量は day0 が最も高く（S/N=16.83），以後 RBC 投与前までは Hb 値の減少と共に低下傾向を認めた．輸血投与前後の推移については投与前の S/N=7.00（day11）に対して，輸血直後で S/N=1.59（day14），1.49（day22）と著しい減少が認められたものの，day37 頃より再び微増し，day 51 では S/N=1.62 まで増加していた．day79 より再び減少傾向が認められ day142 で S/N=1.24 と最も低い値となり DAT も陰性化していた．

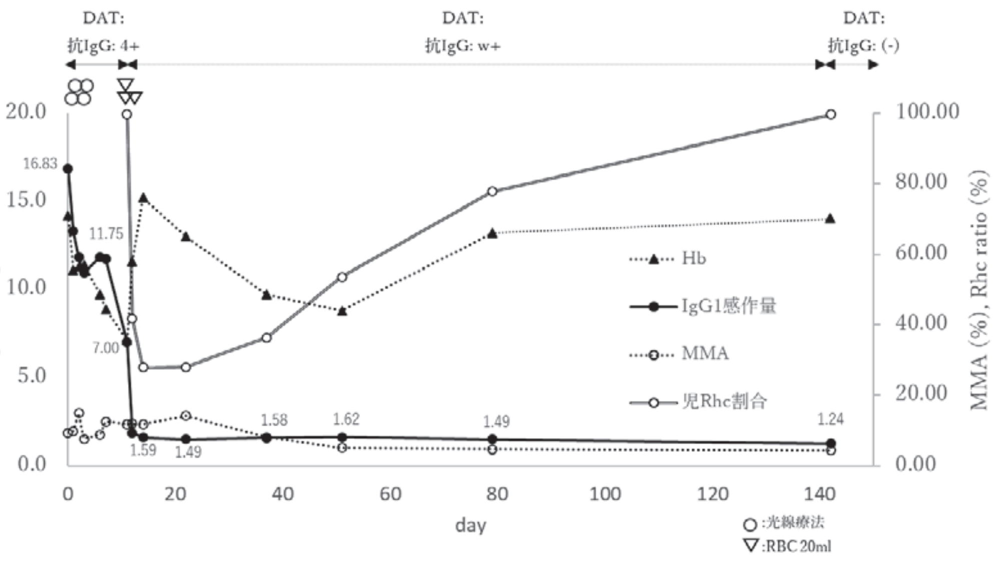


Fig. 4　児赤血球のDAT，抗E結合量（IgG1），MMA，Rhc抗原陽性赤血球量の推移

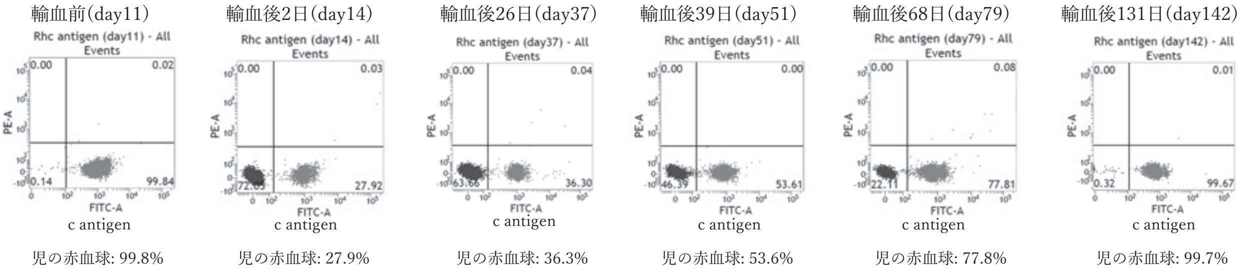


Fig. 5　児のRhc抗原陽性赤血球量解析

③MMA

母親血漿を用いたMMAの検討では抗体価が増加するにつれて貪食率が上昇し出産直前が最も高い値(50.9%)を示した．また出生時の児血漿を用いた検討では出産直前の母親血漿の値に比べ約半量程度となる27.4%を示したが，day51では5.11%と低値となった．

母児の血漿を用いたMMAの結果についてもIgGサブクラス解析と同様に抗体価と正の相関が得られた(Fig. 2)．

児の赤血球を用いたMMAについては出生直後より10%前後を推移しており，いずれも過去の報告[6)~8)]による評価方法を基に検討すると陰性と考えられる結果となった．

④輸血後の児の赤血球量解析

Rhc抗原割合の推移をFig. 4に，結果をFig. 5に示す．児は2日間のRBC輸血後に自身の赤血球割合が約27.9%まで低下していたがday37頃より上昇傾向を認め，再度貧血を生じたday51には53.6%まで増加，その後は貧血の改善と共に児赤血球の割合も上昇し，day142には輸血された赤血球がほぼ消失していた．

考　　察

本症例において，母児の血漿を用いたIgGサブクラス解析の結果から抗E抗体価とIgG1の値に正の相関を認めたことからFCMによる解析は特異性の判定のみならず，量的な変動をより詳細に反映しているものと考えられた．

母親血漿を用いたMMAの検討については抗体価及びIgG1の増加と共に貪食率の増加傾向が認められているが，最大で約50.9%と過去の伊藤らの報告[8)9)]では溶血を起こす値としてはグレーゾーンと考えられる結果であった．

輸血前の児について赤血球表面のIgG1値が貧血の進行と共に低下を認めたが，その間DATは抗IgG試薬に対して4+の凝集を示していた(Fig. 4)．この点からIgG1値の低下は抗Eが感作した児の赤血球が貪食されたことにより生じたものと推察される．また輸血直後よりDATが弱陽性化した点については輸血されたE-の赤血球量が児の血液中の約70%以上を占めた事により，赤血球全体に対するIgG1の感作量が低下したものと考えられた．

次にday51までに再度貧血が進行した点について，

Table 2 輸血後の Rhc 抗原量から算出した児 Hb 値

日数		児 Rhc 抗原 陽性赤血球量（%）	児 Hb 測定値 （g/dl）	児 Hb 予測含有量 （g/l）
day11	輸血前	99.8	7.1	7.1
day12	輸血後 1 日	41.7	11.6	4.8
day14	輸血後 2 日	27.9	15.2	4.2
day22	輸血後 11 日	28.0	13.0	3.6
day37	輸血後 26 日	36.3	9.7	3.5
day51	輸血後 40 日	53.6	8.8	4.7
day79	輸血後 68 日	77.8	13.2	10.3
day142	輸血後 131 日	99.7	14.0	14.0

輸血後 Hb 値と Rhc 抗原量の積から児の予測 Hb 量を算出したところ，day37 までに 3.5g/dl まで低下していた（Table 2）．しかしながら day51 においては予測 Hb 含有量が 4.7g/dl まで上昇しており，この点から day 37 前後までの貧血は抗 E による溶血が進行し，day51 前後における貧血はそれまでの溶血による赤血球の破壊と輸血された赤血球の消費，更に児の造血が不十分であったため生じたものと考えられた．それらを示す兆候として IgG1 ヒストグラムパターン（Fig. 3）において N.C が 99% となる領域を陰性域（P2），それ以上の陽性域を P1 としてゲーティングした際，day14 から day37 までは 16.4～15.7% の赤血球が陽性域にあり，その間の児赤血球割合（27.9～36.3%）に占める IgG1 感作赤血球量を換算すると児の赤血球は約 58.8～43.4% が抗 E に感作され続けていた事がわかった．一方で day51 については P1：8.5% まで減少しており同様の換算をすると児赤血球中に占める IgG1 感作赤血球量は 15.9% まで低下していた．児血漿中の抗 E が 1 倍まで低下していた点などを考慮した際，day51 では抗 E による溶血の影響は小さくなり，輸血された赤血球の消費と児の造血産生能不足により全体的な Hb 値の低下を生じたものと推察された．IgG1 の半減期は一般的に 14～21 日程度とされているが，本症例においては 50 日以上も抗体が残存していた事になり，移行した抗体の力価による影響が考えられた．また輸血された赤血球については約 3 カ月程度残存するとされているが[10]，本症例においても輸血後から徐々に低下が認められ，輸血後 131 日目に消失していることから同様の血球寿命であったと考えられた．

児の赤血球を用いた MMA の結果が実際の溶血所見と乖離した理由として，単球の貪食率は抗体価と IgG サブクラスの影響を受けやすい事が考えられた．我々の過去の検討においても IgG3 型の抗体は低力価であっても貪食率が高い値を示すのに対し，IgG1 型ではより高力価でも貪食率が低くなる傾向が認められた[5)11)]．また抗体価による影響についても出産直前の母親血漿（抗体価 128 倍）を用いた検討で IgG1：S/N=79.61（MMA：50.9%）となった事に対して，出生時の児の赤血球表面上に結合していた抗 E は IgG1：S/N=16.83（MMA=9.29），児の血漿中（抗体価 16 倍）に含まれた抗 E は IgG1：S/N=31.69（MMA=27.39%）であった事から児に移行した抗 E が血漿と赤血球それぞれに分散している影響から，いずれの児 MMA の結果も母親血漿を用いた検討より低値となった事が考えられた．不規則抗体の IgG サブクラスは IgG1 より IgG3 由来について溶血が重症化する危険性が報告されており[2)]，当院でも IgG3 優位型の抗 Di^a の HDFN 症例においては児が出生時より重症貧血を認め，交換輸血が必要となった事例を経験している[11)]．対照的に IgG1 優位型の抗 E 不適合症例については抗体価 64～128 倍であっても無症候性を示したものや，生後数日経過してから貧血を呈し交換輸血や赤血球輸血が実施された事例が報告[11)～17)]されている．施設の治療基準も異なり，それらの違いを明確に鑑別することは難しいが，今回の症例からは IgG1 型の抗体は MMA が低値を示し出生直後に貧血を認めない場合においても，遅発性に溶血が進行する可能性が考えられた．また RBC 輸血後においても血漿中に残存する抗体が一般的な IgG サブクラスの半減期を超え残存していた点から，IgG1 型の抗体について HDFN の病態推移を考えた場合により長期的な経過観察の必要性が示唆された．

結　語

FCM を用いた IgG サブクラスの測定は，簡便かつ定性・定量性に優れており，不規則抗体保有の妊婦および HDFN を発症する可能性がある児において同検査法を実施する事は妊娠経過中および児の出生後の病態把握・治療選択の推察に役立つことが考えられた．

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞：本検討は令和 4，5 年度日本輸血・細胞治療学会臨床研究推進事業ならびに令和 4 年度公益信託 臨床検査医学振興基金の助成を受けて実施しました．

文　献

1）日本産科婦人科学会, 日本産婦人科医会：産婦人科診療ガイドライン　産科編，2020, 40―42.

2）前田平生, 大戸　斉, 岡崎　仁, 他：改訂第4版輸血学, 中外医学社，東京，2018, 600―601.

3）Kelin HG, Anstee DJ: Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 12th ed, Wiley-Blackwell, Hoboken, 2014, 499―541.

4）池田和博：JAMT 技術教本シリーズ　輸血・移植検査技術教本第2版，丸善出版，東京，2023, 148―149.

5）蓮沼秀和，石田智子，町田　保，他：IgG サブクラス解析から検討した不規則抗体の臨床的意義. 日本輸血・細胞治療学会誌，67：1―8, 2021.

6）大橋　恒, 石丸　健, 天満智佳, 他：不規則抗体スクリーニングにおける酵素法の意義. 日本輸血細胞治療学会誌, 56：709―715, 2010.

7）宮崎　孔，高橋大輔，佐藤進一郎，他：FCM を用いた単球貪食試験による不規則抗体の臨床的意義の解析. 日本輸血細胞治療学会誌，63：410, 2017.

8）伊藤正一：単球貪食試験による不規則抗体の評価とその臨床的意義．検査と技術，48（6）：597―603, 2020.

9）Ito S, Hishinuma T, Ogiyama Y, et al: Evaluation of erythrocyte autoantibodies with flow cytometric phagocytosis assay. International Journal of Blood Transfusion and Immunohematology, 8: 1―7, 2018.

10）日本輸血・細胞治療学会：赤血球型検査（赤血球系検査）ガイドライン（改訂4版），2022.

11）蓮沼秀和, 石田智子, 岩下洋一, 他：FCM を用いた IgG サブクラス測定における胎児新生児溶血性疾患の重症度評価．日本輸血・細胞治療学会誌，68：267, 2022.

12）佐藤祐樹，佐藤英洋，内海真紀，他：胎児・新生児溶血性疾患の発症に至らなかった高力価抗体保有症例の検討（第2報）．日本輸血・細胞治療学会誌，67：329, 2021.

13）Singh B, Chaudhary R, Katharia R, et al: Prognostic Significance and Prevalence of IgG Subtypes in Rh Haemolytic Disease of Fetus and Newborn. Indian J Hematol Blood Transfus, 37 (3): 442―447, 2021.

14）氏家次郎，石井　勉，有賀裕道，他：妊娠中期以降に産生された IgG_1 抗体により重症黄疸を来した Rh（E＋c）不適合の1新生児例．小児科臨床，54：135, 2001.

15）菅沼広樹，大日方薫，李　　翼，他：RhE 不適合による新生児溶血性疾患の4例―重症化予測と治療法の検討―. 日本小児血液学会誌，24：106―110, 2010.

16）大川原奈美，藤川甲文，石上園子，他：抗E不適合による新生児溶血性疾患の一症例．埼臨技会誌，53：226, 2006.

17）宮林　寛，清水正樹，菅野啓一，他：RhE 不適合による新生児溶血性疾患12症例の検討．日本周産期・新生児医学会雑誌，49：618, 2013.

IgG SUBCLASS ANALYSIS FOR NEONATAL HEMOLYTIC DISEASE CAUSED BY MATERNAL ANTI-E

Hidekazu Hasunuma[1], *Tomoko Ishida*[1], *Hiroki Otaki*[1], *Youichi Iwashita*[1], *Tamotsu Machida*[1], *Sanshiro Nakao*[2], *Mizuki Nonaka*[3], *Sayaka Suzuki*[4], *Akiko Takashima*[3], *Yasuhiro Kawase*[4] *and Naomi Shimizu*[1)2]

[1]Division of Blood Transfusion, Toho University Sakura Medical Center

[2]Department of Hematology, Toho University Sakura Medical Center

[3]Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University Sakura Medical Center

[4]Department of Pediatrics, Toho University Sakura Medical Center

Abstract:

We experienced a case of hemolytic anemia in a baby at late onset from a pregnant woman with anti-E titer, 128 times. Red blood cell (RBC) transfusion performed on day 11 after birth resulted in an improvement in hemoglobin, but anemia recurred 51 days later. We measured the IgG subclass and conducted a Monocyte Monolayer Assay (MMA) over time, and then analyzed the association of the condition of the mother and the child's RBC ratio post-transfusion.

Anti-E of the mother and the baby were of the IgG1 type, and MMA rates were low in both.

The delayed progression and recurrence of hemolysis in this case were due to the low MMA, resulting from the anti-E derived from IgG1 type, and because the remaining anti-E reacted with the baby's RBCs that were regenerated after transfusion.

Neonatal hemolytic disease caused by anti-E, high-titer IgG1 requires long-term follow-up. Analysis of IgG subclasses of irregular antibodies in pregnant women may help predict the pathology of Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN).

Keywords:

irregular antibody, hemolytic disease of the fetus and newborn, IgG subclass, flow cytometry, monocyte monolayer assay

©2024 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

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