

DEL 型赤血球輸血後に抗 D を検出した RhD 陰性の 1 症例

千葉 勇希 松橋安紀子 久米田真奈 白井 竜二 小野寺佳子
大浦 敏博

今回我々は、RhD 陰性患者に RhD 陰性製剤の輸血を実施していたにもかかわらず、抗 D が検出された症例を経験した。日本赤十字社東北ブロック血液センターに使用製剤の遺伝子解析を依頼した結果、直前に輸血した製剤のドナーに DEL 型に特徴的な RhD 遺伝子変異 (c.1227G>A) を認めた。輸血以外に抗 D を産生する要因が否定的であることから DEL 型の赤血球輸血が抗 D の産生に関与したと推察された。本症例は临床上、明らかな溶血所見は認めなかった。DEL 型の免疫原性は低いと考えられるが、DEL 型製剤の輸血が抗 D 産生に関与したとする報告が散見される。そのため、RhD 陰性妊婦における胎児新生児溶血性疾患の防止や抗 D 保有者の溶血性輸血反応の予防のために可能な限り DEL 型製剤の輸血を回避する必要があると考えられた。また、DEL 型は C 抗原を併せ持つことも知られているため、これらの患者には D 及び C 抗原陰性の製剤を用いることが、安全な輸血とコストや需給バランスの面からも合理的な製剤選択と考える。

キーワード：DEL, 抗 D, Rh 血液型, RhD 陰性, RHD 遺伝子

はじめに

本邦における RhD 陰性者は約 0.5% であるが、RhD 陰性と判定された約 10% は D 抗原の発現量が極めて弱いため通常の検査では D 陰性と判定されている可能性がある¹⁾。これらの変異型は抗 D による吸着解離試験によってのみ抗原が検出される表現型であり、DEL 型として知られている¹⁾。DEL 型の免疫原性は低いと考えられるが²⁾³⁾、Shao らは DEL 型赤血球を輸血した D 陰性患者 7 例中 1 例 (14.3%) に抗 D の産生を認めたと報告している⁴⁾。しかし纏まった研究が少なく、DEL 型赤血球輸血後の抗 D 産生率は不明である。これまで本邦においても DEL 型製剤の輸血が抗 D 産生に関与したとする報告が散見される^{5)~7)}。今回我々は RhD 陰性患者に D 陰性製剤の輸血を実施していたにもかかわらず、抗 D が検出され、その原因が DEL 型赤血球輸血によるものと考えられた症例を経験したので報告する。

症 例

患者は 80 代女性、妊娠歴あり。20XX 年 9 月、前医にて白血球減少と貧血を指摘され精査加療目的で当院受診。輸血前検査は A 型 RhD 陰性、不規則抗体スクリーニング (以下、SCR) 陰性、骨髓検査の結果、骨髓異形成症候群と診断され、外来にて 1~2 回/月の頻度で赤

血球輸血を行っていた。翌年 9 月、赤血球輸血時の SCR が陽転したため、抗体同定検査を実施した。その結果、抗 D に特異性を認めた。抗 D 検出までに輸血された赤血球製剤 13 バッグのうち、サンプルが入手できた 5 バッグについて遺伝子解析を行ったところ、抗体産生 2 週間前に輸血された 1 バッグに、DEL 型に典型的な RhD 遺伝子変異 (c.1227G>A) が確認された。なお、DEL 型は C 抗原を併せ持つことが知られているが²⁾、C 抗原陽性製剤は 20XX 年+1 年 3 月に輸血された赤血球と同年 8 月 19 日に輸血された上記の DEL 型赤血球のみであった。DEL 型赤血球輸血後に LD が軽度上昇したが、明らかな溶血所見は認めなかった。抗 D 同定後は、DEL 型赤血球製剤の輸血を回避する目的で D 抗原陰性かつ C 抗原陰性製剤を用いて継続的に輸血を施行した。抗体価の上昇はなく、溶血性輸血反応も認めなかった (Fig. 1)。

方 法

①輸血前検査

血液型検査、SCR および交差適合試験は BIO-RAD 社の全自動輸血検査装置 IH-1000 にてカラム凝集法で実施した。SCR は low ionic strength solution-indirect antiglobulin test (LISS-IAT) 及び papain を用いた酵素

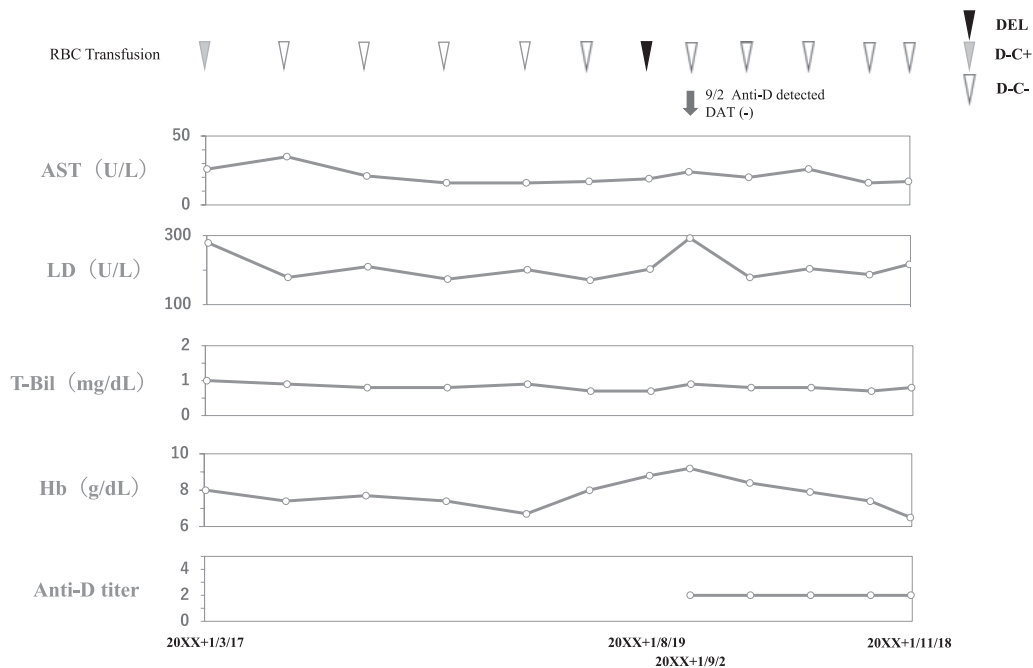


Fig. 1 Clinical course of events

2 段階で実施した。交差適合試験は LISS-IAT で実施した。

D 陰性確認試験および Rh フェノタイプは Ortho 社のバイオクロン抗 D, 抗 C, 抗 c, 抗 E, 抗 e を用い試験管法で行った。不規則抗体同定検査は Ortho 社のリゾルブパネル A を用い, 試験管法で生理食塩液法, プロメリン 1 段法, polyethylene glycol (PEG)-IAT を実施した。サンプルは SCR 陽転時に得られた血漿を用いた。抗体価の測定は試験管法で反応増強剤無添加-IAT (37°C 60 分) を実施した。直接抗グロブリン試験 (direct antiglobulin test, DAT) は Ortho 社のクームス血清バイオクロン, 抗ヒト IgG 血清, バイオクロン抗 C3b, C3d を用い, 試験管法で行った。

②抗 LW との鑑別

Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗浄したパネル赤血球 1 容に対して 4 容の 0.2M dithiothreitol (DTT) を加え, 37°C で 30 分間反応させた。DTT 処理赤血球を PBS で 4 回洗浄後, 3~5% 浮遊液とし, 赤血球浮遊液 1 滴に対し患者血漿 2 滴を加え PEG-IAT を実施した⁸⁾⁹⁾。陰性対照には抗 K 試薬 (Ortho), 陽性対照には抗 E 試薬 (Ortho) を用いた。

③Mimicking 抗体*の確認

*同種抗体のように血液型抗原に対して特異的な反応を示すが, 対応抗原陽性・陰性どちらの赤血球にも吸着される自己抗体

患者血清を D 陽性赤血球 (DccEE), および D 陰性赤血球 (dccee) それぞれを用いて吸着・解離を行い, 抗体同定を行った¹⁰⁾。

赤血球沈渣は BIO-RAD 社の DiaCidel を用いて抗体解離を行った。

④血清学的精査および遺伝子解析

血清学的精査及び輸血した製剤の *RHD* 遺伝子解析は, 東北ブック血液センターに依頼した。*RHD* 遺伝子検査は, 既報に従い PCR-sequence specific primer (SSP) 法にて解析した²⁾¹¹⁾。

結 果

①輸血前検査 (初診時および SCR 陽転時の結果) (Table 1)

初診時: A 型 RhD 陰性, SCR 陰性, Rh フェノタイプ ccEE

SCR 陽転時: SCR 陽性, DAT 陰性, 交差適合試験適合。

②抗体同定検査 (試験管法) (Fig. 2)

パネル検査の結果から抗 D 特異性が認められた。抗 C, 抗 G の特異性については否定できなかった。抗 E は患者抗原から否定した。

③抗 LW との鑑別 (Table 2)

抗 D 様の特異性を示す LW 抗体との鑑別のため DTT 処理赤血球での反応性を確認したが, DTT 処理にかかわらず抗 D に特異性を認めたため, 抗 LW の可能性は否定された。

④mimicking 抗体の確認 (Table 2)

D 陽性赤血球 (DccEE) および D 陰性赤血球 (dccee) を用いて吸着解離試験を行ったが, D 抗原に対する凝集特異性だけでなく, 吸着特異性を認めたため mimick-

Table 1 Pre-transfusion testing

Serological results at initial medical examination

ABO/RhD blood types

CAT	Forward typing		Reverse typing		Anti-D	Rh Control
	Anti-A	Anti-B	A ₁ cell	B cell		
	4+	0	0	4+	0	0

Weak D test (IAT) and Rh phenotype

TT	Anti-D	Rh Control	Interpretation	Anti-C	Anti-c	Anti-E	Anti-e
	0	0		RhD Neg	0	4+	4+

Irregular Antibody Screening

CAT	LISS-IAT				Papain two stage		CAT: Column Aggregation Test TT: Tube Test
	I	II	III	IV	V	VI	
Cell No.	0	0	0	0	0	0	

Serological results at the time of positive irregular antibody screening

Irregular Antibody Screening

CAT	LISS-IAT				Papain two stage	
	I	II	III	IV	V	VI
Cell No.	1+	2+	0	1+	3+	3+

Direct antiglobulin test (DAT)

TT	broad spectrum	Anti-IgG	Anti-C3b, C3d	Neg Control	Crossmatch Testing
	0	0	0	0	

+	Rh-hr					Kell		Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Sal	Bro	PEG IAT	C.C
	D	C	E	c	e	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P1	S	s	M	N				
1	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	W+	1+	NT
2	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	W+	1+	NT
3	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	1+	1+	NT
4	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	1+	1+	NT
5	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	0	+
6	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	+
7	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+
8	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+
9	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+
10	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+
11	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	1+	1+	+
patient's cell	-	-	+	+	-														0	0	0	+

NT : not tested

Fig. 2 Identification of irregular antibodies by panel study

ing 抗体は否定された。また、DccEE 赤血球上清の結果から抗 C 共存の可能性は否定された。

⑤血清学的精査

抗体同定検査で否定できなかった抗 G の共存は血液センターの精査で確認されず、抗 D のみ保有していた。SCR 陽転時の DAT は陰性であったが、患者赤血球解離液からも抗体は検出されなかった。

⑥輸血に使用された血液製剤の RhD フェノタイプ及び RHD 遺伝子解析 (Table 3)

使用した血液製剤 13 バッグのうち、2 バッグが C

抗原陽性であった。このうち 1 バッグのドナーが DEL 型に典型的な RhD 遺伝子変異 (c.1227G>A) を有していた。もう一方のドナーに関しては遺伝子解析を実施できていないため DEL 型であるかは不明であった。その他、サンプルが入手できた 4 バッグの遺伝子解析を行ったが、すべて d/d であった。

考 察

伊藤らは、RhD 陰性献血者 2,754 例を解析した結果、D 陰性と判定された 240 例 (8.7%) が DEL 型であり、

Table 2 Serological reactivities and the properties of antibody with anti-D specificity, identified by panel study, in DTT-treated RBCs and adsorption-elution tests

Panel cells	DTT treatment							
	-				+			
	D+K+E-	D+K-E+	D-K-E-	D+K-E-	D+K+E-	D+K-E+	D-K-E-	D+K-E-
Patient's serum	2+	2+	0	2+	2+	2+	0	2+
anti-K	3+	NT	NT	NT	0	NT	NT	NT
anti-E	NT	4+	NT	NT	NT	4+	NT	NT

Reactivity with DTT-treated RBCs ruled out anti-LW

NT: not tested

Specimen	Rh phenotype of RBC for adsorption	Antibody specificity	
		Supernatant	Eluate solution
Patient's serum	DccEE dccee	Not detect anti-D	anti-D Not detected

This result shows that each anti-D detected by the adsorption-elution tests did not indicate mimicking specificity

Table 3 Rh phenotype and RhD genotype of transfused RBCs (n = 13)

Date	Rh phenotype	RhD genotype
20XX/9/19	ccdee	d/d
10/15	ccdEe	n.t
11/12	ccdee	n.t
12/10	ccdEe	n.t
20XX+1/1/21	ccdEe	d/d
2/18	ccdEe	n.t
3/17	CcdEe	n.t
4/14	ccdee	d/d
5/12	ccdEe	n.t
6/9	ccdEe	d/d
7/7	ccdEe	n.t
7/29	ccdee	n.t
8/19	CcdEe	Del/d

The 1227G>A variant in RBC transfused just before detection of anti-D

全例 C 抗原陽性であったと報告している²⁾. そのうち 232 例 (96.7%) は既知の RhD 遺伝子変異 (c.1227G>A) を有していた. さらに, これらの報告によると DEL 型赤血球輸血により抗 D を産生した 22 例中 15 例は二次免疫応答による抗 D の上昇と考えられた. 本症例においても妊娠・輸血歴があるため二次免疫応答による抗 D の産生が考えられたが, 一次免疫応答との鑑別は困難であった. 一方, 過去に輸血歴がない RhD 陰性の男性から DEL 型赤血球を輸血後に抗 D を検出した報告^{12)~14)} を数例認めることから, 一次免疫応答によっても抗体を産生しうる可能性が示唆される. また, 伊藤らの報告では東アジアにおいて DEL 型赤血球製剤輸血後に抗 D を産生した症例 17 例中, 溶血所見を認めた症例は 2 例のみであった²⁾. 本症例は DEL 型の輸血後に若干 LD の上昇を認めており, 軽微な溶血があった可能性は否定できないが, Hb の低下や T-Bil の上昇はなく明らか

な溶血所見は見られなかった. 治療経過中, Hb が徐々に低下しているが, 抗 D 検出後は D 及び C 抗原陰性製剤を輸血しているため抗 D による溶血は否定的であり, 原因は原疾患によるものと考えられた. 興味深いことに, DEL 型製剤輸血後に抗 D を産生したこれまでの報告例で患者情報を検索し得た 17 例のうち, 血液疾患患者の報告例はなかった. 輸血後の抗体産生率に関する既報によると, 血液疾患患者は頻回の輸血を必要とするにもかかわらず, 他の疾患に比べ抗体産生率が低いとされる¹⁵⁾¹⁶⁾. その理由として患者が免疫不全状態であることや, 輸血による免疫寛容が考えられているが¹⁷⁾, 今回の症例によって免疫抑制状態にある患者においても DEL 型製剤輸血後に抗 D を産生しうることを示唆され, 非常に稀な症例であったと考えられた. RhD 陰性ドナーから DEL 型を検出するためには吸着解離試験や遺伝子解析が必要となるが, コストや労力の面で現実的ではないと考えられる. 伊藤らは RhD 陰性患者, 特に妊娠可能な患者に対して D 及び C 抗原陰性の製剤を選択する方法を提案しており, D 抗原陰性かつ C 抗原陰性の頻度 (約 80%) を考慮した場合, 製剤の有効利用を妨げず, かつ安価に DEL 型の輸血を回避できると報告している²⁾. これらの方法は RhD 陰性妊婦における胎児新生児溶血性疾患の防止や抗 D 保有患者の溶血性輸血反応の予防が可能であり, 安全な輸血の実施とコストや需給バランスの観点からも合理的な製剤選択と考える.

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: 不規則抗体同定検査, 吸着解離試験及び RHD 遺伝子解析に協力していただいた日本赤十字社東北ブロック血液センターに深謝いたします.

文 献

- 1) 内川 誠：Rh血液型，編者 遠山 博，柴田洋一，前田平生，他，輸血学，第3版，中外医学社，東京，2004.
- 2) Ito S, Ohto H, Ogiyama Y, et al: A practical and effective strategy in East Asia to prevent anti-D alloimmunization in patients by C/c phenotyping of serologic RhD-negative blood donors. *eJHaem*, 2: 750—756, 2022.
- 3) Ohto H, Flegel WA, Safic Stanic H: When should RhD-negative recipients be spared the transfusion of DEL red cells to avoid anti-D alloimmunization? *Transfusion*, 62 (11): 2405—2408, 2022.
- 4) Shao C.P, Wang B.Y, Ye S.H, et al: DEL RBC transfusion should be avoided in particular blood recipient in East Asia due to allosensitization and ineffectiveness. *J Zhejiang Univ Sci B*, 13: 913—918, 2012.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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。日本輸血細胞学会誌，61：416—421, 2015.
- 8) 田中一人，金子なつき，小山内崇将，他：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。日本輸血細胞治療学会誌，63：619—624, 2017.
- 9) AABB Technical Manual 18th edition, Method, 2014, 3—18.
- 10) AABB Technical Manual 18th edition, 2014, 328.
- 11) Ogasawara K, Suzuki Y, Sasaki K, et al: Molecular basis for D- Japanese identification of novel DEL and D-alleles. *Vox Sang*, 109: 359—365, 2015.
- 12) Kim KH, Kim KE, Woo KS, et al: Primary anti-D immunization by DEL red blood cells. *Korean J Lab Med*, 29: 361—365, 2009.
- 13) Shao CP, Wang BY, Ye SH, et al: DEL RBC transfusion should be avoided in particular blood recipient in East Asia due to allosensitization and ineffectiveness. *J Zhejiang Univ Sci B*, 13: 913—918, 2012.
- 14) Yang HS, Lee M.Y, Park T.S, et al: Primary anti-D alloimmunization induced by “Asian type” RHD (c.1227GA) DEL red cell transfusion. *Ann Lab Med*, 35: 554—556, 2015.
- 15) Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM: Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion*, 39: 763—771, 1999.
- 16) 櫻木美基子，清川知子，細川美香，他：輸血後不規則抗体陽性化症例の臨床経過についての検討。日本輸血細胞治療学会誌，59：579—585, 2013.
- 17) Schonewille H, van de Watering LMG, Brand A: Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusion in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: is it time to take precautionary measures? *Transfusion*, 46: 630—635, 2006.

A CASE OF ANTI-D DETECTION AFTER DEL RED BLOOD CELL TRANSFUSION IN AN RhD-NEGATIVE PATIENT

Yuki Chiba, Akiko Matsushashi, Mana Kumeta, Ryuji Shirai, Keiko Onodera and Toshihiro Ohura

Department of Clinical Laboratory Medicine, Sendai City Hospital

Abstract:

We experienced a case in which anti-D was detected in an RhD-negative patient who was transfused with RhD-negative red blood cells (RBC). We requested the Japanese Red Cross Tohoku Block Blood Center to perform a genetic analysis of the blood products used, and found a typical DEL gene (c. 1227G>A) in the donor of the most recently transfused RBC. Since factors other than transfusion were negative for the production of anti-D, it was inferred that transfusion of DEL-type was involved in the production of anti-D. Although the immunogenicity of the DEL-type is considered low, there are scattered reports that transfusion of this type is involved in the production of anti-D. Therefore, it is considered necessary to avoid transfusion of DEL-type RBCs whenever possible to prevent Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN) in RhD-negative pregnant women and hemolytic transfusion reactions (HTR) in anti-D carriers. Since DEL-type RBCs are also known to carry at least one C antigen, and none have a cc phenotype, the use of D and C antigen negative RBCs for patients described previously is a rational choice in terms of safe transfusion, cost, and supply-demand balance.

Keywords:

DEL, Anti-D, Rh blood group, RhD negative, *RHD* gene

©2024 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

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