使用する抗 D 血清により Rh₀ (D) 判定の不一致を認めた 4 例

—D^U判定基準の問題点についての考察—

林 悟 青地 寛 永峰 啓丞
押田眞知子 倉田 義之

大阪大学医学部附属病院輸血部

(平成 3 年 9 月 11 日受付)

REPORT OF 4 CASES WHOSE Rh PHENOTYPE SHOWED CONFLICTING RESULTS BY DIFFERENT ANTI-D REAGENTS

Satoru Hayashi, Hiroshi Aochi, Keisuke Nagamine, Machiko Oshida and Yoshiyuki Kurata
Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital

We experienced 4 cases whose red cells showed negative reaction with polyclonal anti-D reagents and positive with monoclonal anti-D reagents after the immediate spin. The reactivities of 4 cells were between those of D positive and D^U cells. The reactivities of R₁R₂ cells (n=44), which were used as a positive control when D^U testing, with polyclonal anti-D reagents were distributed from 2⁸ to 2¹¹. Four cases were typed D^U or D positive depending on the reactivity of R₁R₂ cells used. The reactivities of 4 red cells determined by ELISA or FCM with polyclonal anti-D reagents were also between those of D^U and D positive cells. We considered that the type of our 4 cases was weak D.

序 言

1946年, Stratton は一部のヒトの赤血球は抗 D 血清との反応が弱い、全く反応を示さないという現象を認めた¹⁾. Race らは、上記のような反応を示す赤血球を D^Uと命名した²⁾.

現在では、D^Uは「食塩液抗 D 血清と反応せず、アルブミン液抗 D 血清でのスライド法または試験管法にて弱く反応するか、間接抗グロブリン試験にて陽性となるもの」と考えられている³⁾. 「日臨技輸血検査標準法」によると、Rh₀ (D) 抗原の検索に用いられている市販抗 D 血清で検査した場合、全赤血球の約99.5%が直後判定(immediate spin, IS)で明らかに凝集して Rh₀ (D) 陽性になる。残りの0.5%の赤血球のほぼ全てが、IS, 37℃加温後、D^U確認試験と呼ばれている抗グロブリン試験(indirect antiglobulin test, IAT)で陰性となり、これらの赤血球は Rh₀ (D) 陰性となる。両者に属さず37℃または IAT にて陽性となる赤血球を D^Uと判定すると記載されている⁴⁾.

今回、われわれは、IS においてポリクローナル抗 D 血清とモノクローナル抗 D 血清の成績間で不一致を認めた一家系を報告するとともに、これらの D 抗原量の測定を ELISA, FCM を用いて検討を行い、併せて、本邦における D^Uの取り扱いの現況と D^U確認試験における問題点など、文献的考察も行ったので報告する。

発端者および検査対象

発端者は供血者として来院した男性(M.M.)である。市販ポリクローナル抗 D 血清(Ortho)を用いた試験管法での直後判定(IS)は陰性であり、D^U確認試験(IAT)にて陽性であったが、モノクローナル抗 D 血清の抗 D 両液性抗体・ネオコクサイ(国際試薬)を用いて検査を行ったところ、IS では弱陽性を示した。精査は発端者とその家族 2 名、さらに同様の反応を示した患者 1 例(S.N.; 54y, Male)を含め 4 例に対して実施した。

試薬および方法

1. 市販抗 D 血清

1) ヒト由来抗 D 血清 (アルブミン液抗体)

ポリクローナル抗 D 血清は Ortho, Dade, Biotest, Gamma, Immucor 社の 5 種類を使用した。

2) モノクローナル抗 D 血清

混合型モノクローナル抗体としては Ortho 社のバイオクロン抗 D (IgM 型モノクローナル抗体と人由来 IgG 型ポリクローナル抗体の混合) および国際試薬の抗 D 両液性抗体・ネオコクサイ (IgM 型モノクローナル抗体と IgG 型モノクローナル抗体の混合) の 2 種類を使用した。

IgM 型モノクローナル抗体としては国際試薬, Biotest 社の 2 種類を使用した。

なお, 試薬陰性対照としてポリクローナル抗体には Rh コントロール (Gamma) を, モノクローナル抗体には Rh コントロール・ネオコクサイ (国際試薬) を用いた。また, IAT にはオーソ多特異性クームス血清「ウサギ」(Ortho) を用いた。

2. Rh₀ (D) 式血液型判定試験

日臨技輸血標準法⁴⁾に準じて試験管法にて行った。凝集反応の強さは AABB の Technical Manual⁵⁾の分類法に従い, 0 (ー)~4+までの数値を用いた。

3. 抗 D 抗体吸着解離法

Rubin 法⁶⁾に従った。すなわち, 生理的食塩液にて 4 回洗浄した被検血球沈層 1 容と抗 D 血清 1 容を混合し, 37℃, 60分感作後, 生理的食塩液にて 6 回洗浄した。洗浄後の赤血球沈層 1 容に生理的食塩液 1 容を加え, さらにエーテル 2 容を混合して, 2 分間ミキサーにて攪拌した後, 37℃, 30分反応後, 3,000rpm, 10分間遠心, 上清を採取し抗体解離液とした。

4. 赤血球膜固相 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

永峰らの方法⁷⁾に従って施行した。すなわち, poly-L-lysine hydrobromide (Sigma) で処理した microplate (Immulon, Greiner) に Rh₀ (D) 陽性赤血球, Rh₀ (D) 陰性赤血球, 市販 D^u赤血球あるいは被検赤血球を固相し, 5mM phosphate buffer (pH 7.3) を加えて溶血させて ghost とした。20倍希釈したオーソ抗 D (Rh₀) 血清 (ヒト由

来アルブミン液抗体, Ortho) を加えて感作後, 二次抗体として alkaline phosphatase (ALP) 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Sigma) を加えて反応させた後, ALP 量を比色定量した。

5. 免疫蛍光抗体法 (Flow Cytometry, FCM)

FCM は田中らの方法⁸⁾に準じて施行した。すなわち, 0.5% 赤血球浮遊液に, 20倍に希釈したオーソ抗 D (Rh₀) 血清 (ヒト由来アルブミン液抗体, Ortho) を加え, 37℃, 1時間, さらに 4℃, 18時間感作した。PBS (pH 7.2) にて 3 回洗浄後, FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG F(ab')₂ 抗血清 (TAGO) を加え室温で 30分感作し, PBS にて 3 回洗浄後に蛍光強度を測定した。蛍光量測定は FACSscan Analyzer (Becton Dickinson) を用いた。

成 績

1. 家系調査

発端者およびその家族のその他の Rh 系血液型を Fig. 1 に示す。

2. 試験管法における IS の成績の比較

Table 1 は, 4 例の被検赤血球の市販抗 D 血清を用いたときの IS での成績の比較である。5 種類の人由来ポリクローナル抗 D 血清では陰性から 1+ の凝集と反応の差を認めた。また混合型モノクローナル抗 D 血清では, weak+ から 1+ の凝集を示し, IgM 型抗 D 血清は混合型モノクローナル抗 D 血清より強い凝集を示した。

対照に用いた Rh₀ (D) 陽性血球 (R₁R₂) においても凝集の強弱は認めたが, 全ての抗 D 血清で陽性, Rh₀ (D) 陰性血球 (rr) はすべて陰性であった。市販 D^u血球は, ポリクローナル抗 D 血清およ

Fig. 1 Pedigree of a family.

Table 1 Results of immediate spin determined by various anti-D reagents

Cases	Polyclonal anti-D					Monoclonal anti-D			
	Ortho	Dade	Biotest	Gamma	Immucor	Dade ^{a)}	Ortho ^{b)}	Biotest ^{c)}	Dade ^{d)}
K. M.	—	—	1 +	w +	1 +	w +	w +	1 +	1 +
N. M.	—	—	w +	w +	1 +	w +	w +	1 +	1 +
M. M.	—	—	1 +	1 +	1 +	w +	1 +	2 +	2 +
S. N.	w +	—	w +	w +	1 +	1 +	w +	1 +	2 +
R ₁ R ₂	3 +	2 +	4 +	3 +	4 +	4 +	4 +	4 +	3 +
D ^U	—	—	—	—	—	—	—	w +	w +
rr	—	—	—	—	—	—	—	—	—

a: Mixtures of IgG and IgM monoclonal anti-D

b: Blend with IgM monoclonal and polyclonal IgG anti-D

c,d: IgM monoclonal anti-D

Table 2 Comparison in reactivity of 4 cells with various anti-D reagents

Case	Polyclonal anti-D					Monoclonal anti-D	
	Ortho	Dade	Biotest	Gamma	Immucor	Dade ^{a)}	Ortho ^{b)}
K. M.	64	16	128	64	64	16	16
N. M.	128	32	128	256	512	32	32
M. M.	256	64	128	128	128	64	64
S. N.	64	64	128	128	256	16	16
R ₁ R ₂	1024	512	1024	1024	2048	512	1024
D ^U	16	8	16	32	32	32	16
rr	0	0	0	0	0	0	0

a: Mixtures of IgG and IgM monoclonal anti-D

b: Blend with IgM monoclonal and polyclonal IgM anti-D

び混合型モノクローナル抗 D 血清では陰性, IgM 型モノクローナル抗 D 血清では弱陽性を示した。

2. IAT における 4 検体の被凝集価の成績

Table 2 は, IAT での被凝集価の成績を検討したものである。IS で陰性を示した 4 例は, ポリクローナル抗 D 血清では 16~512 倍の被凝集価を認めた。一方, 混合型モノクローナル抗 D 血清では 16~64 倍とポリクローナル抗 D 血清よりも低い被凝集価を示した。対照に用いた Rh₀ (D) 陽性血球 (R₁R₂) では, 512~2,048 倍, D^U 血球は 8~32 倍の被凝集価を認めた。Rh₀ (D) 陰性血球 (rr) は陰性であった。

3. 吸着解離の成績

被検血球 4 例の解離液と R₁R₂ 赤血球との IAT における反応は, 陽性を呈した。

4. R₁R₂ 血球の被凝集価の分布と被検血球の比較について

日臨技の標準法では, IAT での被凝集価が対照 R₁R₂ 血球の被凝集価と 4 管以上の差をもって D^U と判定するとなっている。

そこで R₁R₂ 血球, 44 例の被凝集価について Ortho 社, ポリクローナル抗 D 血清を用いて IAT での被凝集価について検討した。

R₁R₂ 血球 44 例の被凝集価の分布は 2⁸ を示したものは 23%, 2⁹ は 41%, 2¹⁰ は 29%, 2¹¹ は 7% であった。

Table 3 は被検血球 4 例における IAT での被凝集価の成績と, 対照 R₁R₂ 血球の被凝集価の成績より 4 管以上の差の有無を検討したものである。対照 R₁R₂ 血球の被凝集価が 2⁸ および 2⁹ の時は, 被検血球 4 例とも 4 管以上の差を認めず, 全て Rh₀ (D) 陽性と判定された。しかし R₁R₂ 血球が 2¹⁰ の時は, 4 例中 2 例で, また対照 R₁R₂ 血球が 2¹¹ の時, 4 例中 3 例で 4 管差以上の被凝集価を認

Table 3 Rh phenotype in 4 cases determined using 4 R₁R₂ with different expression of D antigen as a reference

Cases	Reactivities	Reactivities of R ₁ R ₂ RBCs (n=44)			
		2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹
K. M.	2 ⁶	+	+	D ^U	D ^U
S. N.	2 ⁶	+	+	D ^U	D ^U
N. M.	2 ⁷	+	+	+	D ^U
M. M.	2 ⁸	+	+	+	+

め D^Uと判定される結果となった。

5. ELISA による成績

Fig. 2 は赤血球の D 抗原量を ELISA にて測定した成績である。Rh₀ (D) 陰性血球では吸光度 (OD) は 0.079, D^U血球で 0.132, 被検血球 4 例では, 0.167~0.191 の範囲であった。Rh₀ (D) 陽性対照の OD は 0.549 から 0.734 の範囲であった。

6. FCM による解析

Fig. 3 は, FCM で測定した成績である。蛍光強度は, 市販 D^U血球は, Rh₀(D)陰性血球と Rh₀(D)陽性血球の間に位置した。また, 被検血球 4 例は, D^U血球と Rh₀ (D) 陽性血球との中間に位置した。

7. D variant の検索

一家系 3 例において D variant か否かの検索を行ったが, D variant は認められなかった。

Fig. 2 Reactivity of 4 cells with anti-D reagent determined by ELISA.

考 案

近年, モノクローナル抗体の開発が盛んに行われて, ABO 式血液型に対するモノクローナル抗体や抗 D モノクローナル抗体⁹⁾などの血液型判定用抗血清の分野においてもモノクローナル抗体が普及してきている。従来の抗血清はほとんどがヒト由来のため, 安定供給や感染などの問題点が存在したが, モノクローナル抗体はそれらの問題点を克服しており, 今後ますます普及するものと思われる。一方, D^Uの判定基準などは従来のポリクローナル抗体を基準に作成されているので, 新し

Fig. 3 Histogram profiles of 4 cells determined by FCM.

い性質の異なった抗血清が導入されることにより、従来の判定基準のみでは不十分なことも起こりうる。van Rhenen らは、weak D と判定された赤血球を市販のポリクローナル抗 D 抗体とモノクローナル抗 D 抗体を用いて反応性を検討し、成績の不一致を認める症例が存在することを報告している¹⁰⁾¹¹⁾。今回、われわれが報告した 4 例も彼らの成績に一致するものである (Table 1, 2)。

日臨技の標準法では、D^u確認試験では IS 陰性で、IAT での被凝集価が対照の R₁R₂ 血球の被凝集価と 4 管以上の差をもって D^u と判定するとなっている。Table 3 に示した如く対照 R₁R₂ 血球の抗 D 血清に対する IAT の被凝集価は 2⁸~2¹¹ の分布であり、被凝集価の異なる対照 R₁R₂ 血球を用いて管差だけで判定すると、対照に用いる R₁R₂ 血球によって、あるものは D^u と、あるものは Rh₀ (D) 陽性と判定される可能性がある。一方、河瀬らは D^u 確認試験の際には、被検血球の抗 D 血清に対する IAT の被凝集価が 32 倍以下を D^u、それ以上を Rh₀ (D) 陽性としている¹²⁾。しかしながら、この基準によっても用いた抗血清によって異なる判定結果になる可能性があると思われる。

Szymanski ら¹³⁾は、正常な Rh₀ (D) 陽性赤血球と D^u 型赤血球表面の D 抗原量を Autoanalyzer を用いた抗グロブリン消費試験で測定し、D^u 血球の D 抗原量は Rh₀ (D) 陽性血球の 10~20 分の 1 の量であったと報告している。ELISA や FCM を用いた今回のわれわれの成績においても、D^u 血球の抗原量は Rh₀ (D) 陽性血球より著明に低く、彼らの成績に一致していた。また、被検血球 4 例の D 抗原量は、ELISA での OD は Rh₀ (D) 陽性血球と比較し明らかに低値ではあったが、D^u 血球よりも若干高値を示した (Fig. 2)。FCM で検討した被検血球 4 例の D 抗原量も、D^u 血球と Rh₀ (D) 陽性血球の間の成績を示した (Fig. 3)。以上の成績より、対象 4 例は、“weak D” (弱陽性) と判定するのが妥当と考えられた。

D^u 確認試験の基準は概ね学会レベルなどでは決定されているが、新しく導入された試薬が従来の抗血清と大幅に異なる場合は今回のように混乱を来すことになる。今後さらに D^u の意義も含めて

検討しなければならないと思われる。

結 語

1. Rh₀ (D) 検査において直後判定にて市販ポリクローナル抗 D 血清と市販モノクローナル抗 D 血清の間に成績の解離を認めた 4 症例を経験した。

2. 4 症例の被凝集価は R₁R₂ 血球の被凝集価と D^u 血球の被凝集価との間に位置した。

3. D^u 判定の際に Rh₀ (D) 陽性対象として用いられる R₁R₂ 血球 (n=44) の被凝集価は 2⁸~2¹¹ に分布した。そのため、用いる対象 R₁R₂ 血球により、4 例は D^u あるいは Rh₀ (D) 陽性と判定された。

4. ELISA および FCM による被検血球の抗原量は市販 D^u 血球と Rh₀ (D) 陽性血球との間に位置した。

5. 今回の症例は、“weak D” と判定するのが妥当と考えられた。

謝辞：D variant の精査をしていただいた大阪府血液センターの永尾暢夫先生に深謝致します。

本論文の要旨は第 39 回日本輸血学会総会において発表した。

文 献

- 1) Stratton, F.: A new Rh allelomorph. Nature, 158: 25-26, 1946.
- 2) Race, R.R., Sanger, R. and Lawler, S.D.: The Rh antigen D^u. Ann. Eugen. Lond., 14: 171-184, 1948.
- 3) Stroup, M.: Anti-D BioClone compared with three commercial anti-D reagents and their reactivity with D^u cells. Raritan, N.J.: Ortho Diagnostic Systems, 1989.
- 4) 富田忠夫：日臨技輸血標準法 2. Rh 式血液型判定法。検査と技術, 16: 1155-1159, 1988.
- 5) Widmann, F.K., Editor: Technical Manual. 9th ed. Arlington: American Association of Blood Banks, 1985.
- 6) Rubin, H.: Antibody elution from red blood cells. J. Clin. Pathol., 16: 70-73, 1963.
- 7) 永峰啓丞, 青地 寛, 林 悟, 押田眞知子, 倉田義之：赤血球膜固相 ELISA による抗赤血球抗体検出法 (第 2 報) —Rh 系その他各種抗赤血球抗体の検討—。日輸血会誌, 35: 510-513, 1989.
- 8) 田中光信, 瀬尾たい子, 宮木千弥子, 山本和子, 山口英夫, 大久保康人, 御手洗安興, 内山英一, 宮田義久：フローサイトメトリーによる赤血球抗

- 原の解析〔2〕。間接フローサイトメトリー法による Rh 系抗原の遺伝学的背景。日輸血会誌, 33: 702—709, 1987.
- 9) Bloy, C., Blanchard, D., Lambin, P., Goossens, D., Rouger, P., Salmon, C. and Cartron, J.P.: Human monoclonal antibody against Rh (D) antigen: Partial characterization of the Rh (D) polypeptide from human erythrocytes. *Blood*, 69: 1491—1497, 1987.
- 10) van Rhenen, D.J., Thijssen, P.M.H.J. and Overbeeke, M.A.M.: Testing efficacy of anti-D sera by a panel of donor red cells with weak reacting D antigen and with partial D antigens. *Vox Sang.*, 56: 274—277, 1989.
- 11) van Rhenen, D.J. and Overbeeke, M.A.M.: Quality control anti-D sera by a panel of donor red cells with weak reacting D antigen and with partial D antigens by the federation of Netherlands Red Cross Blood Banks. *Vox Sang.*, 57: 273—274, 1989.
- 12) 河瀬正晴, 木村 都, 有近智津代, 山梨暢子, 岩本澄清: Rh (D) 血液型判定における種々の問題点。衛生検査, 32: 121—126, 1983.
- 13) Szymanski, I.O. and Araszkievicz, P.: Quantitative studies on the D antigen of red cells with the D^u phenotype. *Transfusion*, 29: 103—105, 1989.
-