

母児間および高頻度抗原を含む同種間の血液型不適合輸血 における免疫感作に関する一考察

尾形正裕, 遠山ゆり子*, 安永吉男**

東北大学医療技術短期大学部 衛生技術学科

*福島医科大学付属病院 検査部 (現所属: 福島県衛生研究所)

**福島県立総合衛生学院 臨床検査学科

A Serologic Retrospective Study on Patients with Hemolytic Reaction by Fetomaternal Blood Transfusion, and by Alloimmunization with High Incidence Red Cell Antigen

Masahiro OGATA, Yuriko TOHYAMA* and Yoshio YASUNAGA**

Department of Medical Technology, College of Medical Sciences, Tohoku University

**Central Clinical Laboratories, Fukushima Medical College Hospital*

***Course for Medical Technology, Fukushima Prefectural General Hygiene Institute*

Key words: Fetomaternal blood transfusion, Incompatibility of red cell antigens, ABO/Rh/
Lewis blood group systems, Jacobs' high-incidence antigen (Jr^a)

Adverse transfusion reactions means harmful effects of transfusion other than expected proper effect. This may occur since blood transfusion is a sort of transplant of other's blood tissue. Typical acute adverse reaction is a hemolytic reaction due to an incompatible transfusion. It is also well-known the mother may exhibit alloimmunization to antigens on fetal red blood cells (RBC), and the fetus may be affected by maternal antibodies provoked by previous pregnancies, by previous or present allogous blood transfusions, or by the ongoing pregnancy.

We determined immunoglobulin subclasses using elution procedure and direct antiglobulin test for the RBC antibodies obtained from three patients with hemolytic disease of the newborn, and a non-pregnant woman with hemolytic reaction due to the Jr^a-incompatible transfusion.

The IgG antibodies were identified three subclasses except IgG₄. In subjects alloimmunized to RBC, anti-RBC antibody-bearing B lymphocytes can be demonstrated by observing 'rosettes'. The rosetting could be demonstrated in two of the four women immunized by pregnancy and blood transfusion.

はじめに

ABO, Rh, Kell などの赤血球血液型は同種間の

免疫応答を惹起し, Lewis にみられる血漿成分も血球に吸着して, 血液型不適合性溶血性副作用の原因となることが知られている。Jr^a, Fy^a, Cr^a な

どは高頻度に発現する血液型抗原として知られており、高頻度抗原が陰性または低頻度抗原が陽性の個体は ABO, RhD などの主要な血液型が一致する同種血輸血または妊娠による母児間輸血の結果、同種免疫を惹起して発見されることが多い。

高頻度抗原のひとつである血液型 Jr^a を欠き過去一回の同種血輸血により抗 Jr^a 抗体の産生をみて、Bombay (Oh), Di (b-) などと同様に“まれ血”として登録し次回の輸血に備えることとなった本学女子学生を精査する機会を得た。

今回、この不適合同種血輸血例と、血液型不適合妊娠による新生児溶血性疾患 (hemolytic disease of the newborn, 以下, HDN と略す) の laboratory diagnosis に関わった症例についての

遡及的調査を試み、若干の免疫学的知見を得た。母児間および同種間の不適合輸血により免疫感作を惹起した我々の症例の分析結果を報告するとともに、妊娠可能な女子への輸血に際して、医療従事者に課された輸血血液の適正な選択がいかに重要であるかを同種免疫の視点から改めて問題提起したい。

対象ならびに方法

1. 対象

血液型不適合妊娠および不適合輸血により溶血性状を呈した患児 (症例 1~3), 未妊・未産の女性 (症例 4) および母体の血液 (臍帯血, 末梢血) から分離した血清, 赤血球, リンパ球を対象とした。

Table 1. The Clinical background of four women alloimmunized to red blood cells.

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Subject :				
Age (years old)	37	30	31	26
Occupation	Housewife	Housewife	Housewife	Student
Symptom	Pregnancy	Pregnancy	Pregnancy	Vesicoureteral reflux
History :				
Preg./Deliv.	2p/2d	1p/1d	0p/0d	non
Operation	non	Cesarean section	Epiduralmyelocyst Urethroostomy	Ureterovesicostomy
Blood transfusion (Unit)	non	non	yes, 3 times 15U at 17 y 1U at 18 y 1U at 24 y	yes 1U at 23 y
Laboratory findings :				
Hematologic ; RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	324	410	NT*	348
Hg (g/dl)	9.8	12.0	NT	11.3
Hct (%)	28.2	36.3	NT	36.2
Acid-elution stein	3+	3+	NT	NT

Immunologic ; ABO	O	A ₁	O	O
RhD	+ (CcDEe)	- (ccdee)	+ (ccDEE)	+ (CCDee)
Other blood type		Le(a-b-)		Le(a-b+), Fy(a+b-) Jr(a-), MNs, Di(a-b+)
IAT ¹⁾	positive [†]	positive	positive	positive
Identified antibodies ²⁾	anti-A,B	anti-Le ^a	anti-C	anti-c, anti-E, anti-Jr ^a
DAT ³⁾	(-)	(-)	(-)	(-)

¹⁾; Indirect antiglobulin test with group O panel red blood cells, [†]; Using a group A and/or B panel red blood cell, ²⁾; Irregular antibody, ³⁾; Direct antiglobulin test using multispecific antiserum, *; Not tested

Table 2. Clinical course of the three newborn infants affected by maternal alloantibodies and their pedigree-method

Case No	Clinical course						Pedigree	
	Day after birth						Parents	
#1 3 rd ■ Term delivery B, CCDee	0	2	4	6	8		□ 36y. A ₁ B CcDEe	○ 37y. O CcDEe
Unbilical cord blood ;							Siblings	
DAT	3+						1 st ○ 12y. Not tested	
RBC (×10 ⁴ μg/ml)	340		489				2 nd ■ 10y. A, CCDee	
Hb (mg/dl)	12.3		18.4				Intellectual obstacle	
Hct (%)	36.9		53.4		62.0 55		(Bilirubin encephalopathy?)	
TB (mg/dl)	3.5 8.4		10.6		11.8 10.3		10.8	
#2 2 nd □ Term, cesarean section with CPD A ₁ , ccDee, Le(a-b-)	0	1	5	14			□ 34y. O, Le(a-b+) RhD+	● 32y. A ₁ , Le(a-b-) ccdee
Unbilical cord blood ;							Siblings	
DAT/IAT	+(doubtful)/+						1 st ○ 2y. A, RhD+	
RBC/Hb	424/14.7						Le(a+b-)	
TB	3.2 6.9		9.5		2.8			
#3 1 st ■ Term, cesarean section O, CcDEe	0	4	8	12	16		□ 27y. A ₁ CCDee	● 31y. O ccDEE
Peripheral blood ;								
DAT	3+							
RBC	495		311		243			
Hb	18.2		10.9		8.7			
Hct	51 46		43		30 24			
TB	17.9 18.6		18.5		12.2 12.4 9.3 5.6			
IAT	+(anti-C)						+	

Abbreviations: DAT; direct antiglobulin test, RBC; red blood cells, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, TB; total bilirubin, IAT; indirect antiglobulin test

各症例の既往歴、検査所見と患児の臨床経過、家系調査などはそれぞれ表1と表2にまとめた。概略は以下の通りである。

[症例1] 第二子がビリルビン脳症であった可能性のある分娩既往歴があり、O型で、貧血と間接抗グロブリン試験 (indirect antiglobulin test, 以下, IAT と略す)陽性を呈した妊婦が正期産、自然分娩による第三子を出産。児の臍帯血はB型で、母児間にRhDの不適合はないものの直接抗

グロブリン試験 (direct antiglobulin test, 以下, DAT と略す)陽性で、出生当日に早発性新生児黄疸を呈したため直ちに補液と光線療法が施行された。父親の血液型はAB型, RhD陽性。黄疸は生後4日目をピークに漸減し、経過良好なため生後9日目に外来通院となった (臨床診断: ABO血液型不適合性高ビリルビン血症)。

[症例2] Rh不適合児の分娩歴を有する2妊2産目の妊娠13週時の検査成績がA型, RhD陰

性(ccdee型), Le(a-, b+)で, それ以降, 抗Le^a抗体によるIAT持続陽性の母親が児頭骨盤不均衡から帝王切開による正期産の第二子を分娩。配偶者の血液型はO型でRhD陽性, 第一子はA型・RhD陽性, Le(a+, b-)。児の臍帯血はA型, IAT陽性, Le(a-, b-)型ながらDATは疑陽性で, 黄疸に特段の異常を認めず。総ビリルビン値は生後5日目に9.5 mg/dlを呈したがそれをピークに漸減し, 生後14日目に退院となった。なお, 母親は抗RhD抗体陰性, 且つ, γグロブリン投与による抑制処置が未処置であったため, 産褥2日目にはじめてRhD免疫グロブリン製剤の投与がなされた(臨床診断: 新生児黄疸, RhD不適合分娩)。

[症例3] 脊椎損傷で, 16歳から24歳にかけて脊髄硬膜外嚢腫などの手術のため約17単位の同種血輸血歴を有する初妊婦が, 開排制限のため帝王切開による正期産の第一子を分娩。児は早発性黄疸が出現し増強。生後1日目に総ビリルビンが17.9 mg/dlに上昇し, 光線療法を開始。児末梢血の免疫学的検査所見はO型, RhD陽性, DATならびにIAT陽性。母親はO型・RhD陰性でIAT陽性のため, 母児血清中の不規則抗体検査を実施して抗C抗体が同定された。Rh血液型精査の結果, RhC不適合と判明。その後, 児の貧血が亢進したため, 生後14日目にRh適合血(ccDEE)を30 ml輸血したところ軽快を見, 生後19日目に外来通院となった(臨床診断: RhC不適合性溶血性黄疸)。

[症例4] 先天性の尿管疾患を有する未妊・未産の女子学生が上行性腎盂腎炎を発症したのを機会に, 3年前, 両側膀胱尿管逆流防止術施行に際して1単位の同種血輸血を受けた。本学の免疫学関連実習において, IAT陽性から赤血球不規則抗体の存在が示唆された。日赤血液センターにて精査の結果, RhD以外の複数のRh関連抗体と高頻度抗原Jr^aに対するJr^a同種抗体などが同定された。

2. 方法

1) 血漿・赤血球・白血球の凍結保存と調製
無菌的に採取した各種血液を低速遠心分離後,

血漿は-30°Cに凍結保存し, 白血球層は20%の濃度にDMSOを添加混合してプログラムフリーザーにて段階的に冷凍し, 液体窒素フリーザーに保存した。赤血球層はCPD液に置換後, Merymanの方法¹⁾に従ってグリセリン, 乳酸ナトリウムを主成分とする凍害保護液中に-80°C下で保存した。これらの凍結試料は通常の解凍および脱グリセリン処理後, 試験に供した。

2) 血液型の判定²⁾

ABO, Rh血液型の判定は市販の標準抗血清と標準血球試薬を用い, 試験管法にて添付の指示書に従っておこなった。RhD陰性の判定はD^u確認試験を併用した。Lewis, Duffy, MNSなどの血液型も同様の方法にて実施した。Jr^a血液型の有無は日赤血液センター保有の複数の抗Jr^a抗体を用いてクームス法にておこなった。

3) 血清中の赤血球不規則抗体の同定³⁾

血中に遊離する不規則抗体の同定は市販の同定用パネル赤血球を用いて, 食塩液法(22°C), 酵素法(プロメリン, 37°C)アルブミン・クームス法(37°C)にておこなった。低温性抗体の共存が考えられる症例については低温性抗体の影響を回避するために食塩液法を37°Cでおこなってからクームス法(37°C)を実施した。

4) IgGサブクラスの同定

市販のヒツジ抗ヒトIgGサブクラス抗体(MBL社, 名古屋)をO型のプール血球にて十二分に吸収後, それぞれをサブクラス特異的クームス血清試薬とした抗グロブリン試験にて凝集の有無から同定した。解離試験にて得られた解離液中のサブクラスの判定はIAT, および, ELISAを測定原理とする市販のヒトIgGサブクラス測定キット(MBL社)を用いた2法にて定性的におこなった。IAT用のパネル赤血球は新生児と同一の対応抗原を有するものを用いた。

5) 抗グロブリン試験³⁾

末梢血, 臍帯血由来の血清中抗赤血球抗体の検出(IAT)と同種抗体感作赤血球の検出(DAT)は3種類のクームス血清を用いておこなった。すなわち, 通常の広域クームス血清, IgG特異的クームス血清(いずれもOrtho社, 米国)と, 4)で自家

調製した IgG サブクラス特異的クームス血清の 3 種である。

6) 抗体解離試験⁴⁾

DAT 陽性の赤血球から対応抗体を回収する解離試験は、ABO 血液型不適合例では熱解離法、それ以外の血液型不適合例では ZZAP 法にておこなった。得られた解離液を 4) の被検試料に供した。

7) 抗赤血球抗体産生 B リンパ球の検出

白血球層から比重法にて末梢血単核細胞を分離して調整した被検リンパ球浮遊液 (5×10⁶/ml) 1 容と、対応抗原陽性のパネル赤血球の FBS 浮遊液 (0.5% (v/v)) 1 容とを混和した。200×G で 5 分間遠沈後、37°C で 45 分間加温静置してから沈層を採取して顕微鏡下でロゼット形成細胞の有無を観測した。対照として被検リンパ球と対応抗原陰性のパネル赤血球 (母体血を含む) との反応を

同様におこなった。判定法は単核細胞への赤血球の付着数が 10 個以上を陽性、4~9 個を±、3 個未満を陰性とした。

結 果

血清中の不規則抗体の反応性状と抗体価

各症例における不適合の血液型、同定された血中抗赤血球不規則抗体の反応性状とその抗体価を表 3 にまとめた。

症例 1 においては、同定された母体血中抗体の反応性状は食塩液法と食塩液・クームス法で凝集を呈したが、後者の方が高抗体価であった。DTT で還元処理した血清では、抗 A 抗体がなお食塩液法で 80 倍の抗体価を示したのに対して抗 B 抗体は陰性化し、通常のアルブミン・クームス法で 320 倍の抗体価を呈した。いずれの反応系においても抗 A 抗体の方が抗 B 抗体よりも高値であった。

Table 3. Type-specificity and titer of antibodies in the serum obtained from the mother and nulligravida against fetal or allogeneic red blood cell antigens.

Case		Incompatible blood groups	Identified antibodies	Chalacteristics and titers of antibody			
No	Type			saline 22°C	enzyme	albumin•coombs 37°C	saline • coombs 37°C → 37°C
# 1	FM-BT ¹⁾	ABH	Anti-A	1:160	NT [§]	NT	1:1280
			Anti-B	1:160	NT	NT	1:320
			Anti-A [¶]	1:80		1:1280	
			Anti-B [¶]	—		1:320	
# 2	FM-BT	Lewis	Anti-Le ^a	1:2	1:2	1:2	1:1
		Rh	Non*	—	—	NT	—
# 3	AL-BT ²⁾ & FM-BT	Rh	Anti-C	—	1:1280	>1:2560	NT
# 4	AL-BT	Jacobs	Anti-Jr ^{a***}	—	±	1:512	NT
		Rh	Anti-c ^{***}	—	2+	1:512	NT
			Anti-E ^{***}	—	3+	1:1024	NT

¹⁾; Fetomaternal blood transfusion by means of transplacental hemorrhage.

²⁾; Allologous blood transfusion

[¶]; DTT-treated serum. [§]; Not tested

*Le(a-b+)/R₁R₂ blood, **Jr(a+)/R₁R₁ blood, ***Jr(a-)/R₁R₂ blood, were used for panel cells.

症例2の抗Le^a抗体は、低温性IgM自然抗体の多くを検出する食塩液法のみならずIgG免疫抗体の検出に有用なブロメリン法とクームス法で検出された。低温性抗体の影響を回避する食塩液・クームス法においても1:1と低力価ながら反応する性状が確認された。なお、IAT陽性の児の血中抗体も本法にて陽性であることが確認された。

症例3の母体血中のRh関連抗C抗体は食塩液法においては反応せず、ブロメリン法とクームス法で検出されていずれも高い抗体価を呈した。クームス法では2,560倍以上であった。

症例4の抗体については、Jr(a-)のR₁R₂パネル血球を用いておこなったRh関連抗cと抗E抗体は症例3と同様の反応性状を有し、抗体価は抗E抗体の方が1管高い1,024倍であった。Jr(a+)でc抗原とE抗原を欠くR₁R₁パネル血球を用いておこなった抗Jr^a抗体はクームス法で特異性が確認され、その抗体価は512倍と高力価であった。さらに、Jr(a-)・R₁R₂・Di(a-)・Ssパネル赤血球を用いたクームス法で陽性反応を呈したため、MNSs式血液型に関連する抗S抗体の存在が疑われる結果を得た。

Table 4. Identification of the immunoglobulin subclasses and the antibody-bearing B lymphocytes against blood group antigens.

Case No	Material ¹⁾ RBC, dissociated fluid from RBC, serum & PBL	Identified antibodies	Subclasses of red cell alloantibody					B cell rosetting		
			Antiglobulin test					ELISA ²⁾ Ig ⁻	Panel RBC	
			IgG	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄		Ag(-)	Ag(+)
1.	Infant's RBC		2+	+	2+	+	-	G ₁ , G ₂ , G ₃		
	Dissociated fluid*	Anti-B	2+	+	2+	+	-			
	Serum ; Mother	Anti-B	2+	2+	+	+	-			
		Anti-A	3+	+	3+	2+	-			
	Infant	Anti-B	3+	+	3+	+	-			
		Anti-A	3+	2+	3+	+	-			
Mother's PBL							-	+		
2.	Infant's RBC		±	-	-	-	-	Non		
	Dissociated fluid	Non	-	NT	NT	NT	NT			
	Serum ; Mother	Anti-Le ^a	2+	+	2+	+	-			
		Infant	Anti-Le ^a	2+	+	2+	-			
	Mother's PBL									
3.	Infant's RBC		3+	2+	±	3+	-	G ₁ , G ₃		
	Dissociated fluid	Anti-C	2+	2+	-	2+	-			
	Serum ; Mother	Anti-C	3+	2+	+	2+	-			
		Infant	Anti-C	3+	+	±	2+			
	Mother's PBL									
4.	Serum	Anti-Jr ^a	3+	2+	-	2+	-			
		Anti-c	2+	+	±	2+	-			
		Anti-E	2+	2+	+	2+	-			
	PBL									

¹⁾: RBC ; red blood cells, PBL ; peripheral blood lymphocytes, * ; Eluate of alloantibody from infant's red blood cells by elution test.

²⁾: Qualitative analysis by means of enzyme-linked immunosorbent assay.

抗赤血球不規則抗体の IgG サブクラス

1) DAT 陽性の新生児赤血球とその解離液:

患児の赤血球に結合している抗赤血球抗体と、その赤血球から解離された抗赤血球抗体の IgG サブクラスを同定した成績とを表 4 に示した。

DAT が 3+陽性の 2 例はいずれも IgG であることが確認され、ABO 不適合の症例 1 においては IgG₂ を中心に IgG₄ を除く 3 種のサブクラスが検出された。IgG₂ の抗 B 抗体が 2+と、やや強い反応が観察された。RhC 不適合の症例 3 においては、IgG₁ と IgG₃ のみが検出され、IgG₃ は 3+とより強い凝集像を呈した。抗 Le^a 抗体を受動的に保有し、RhD 不適合である症例 2 において、ルーチンに実施される広域クームス血清にて疑陽性を呈した新生児赤血球は IgG 特異的クームス血清で±にとどまり、IgG サブクラス特異的クームス血清とは全く反応しなかった。解離液と IgG 特異的クームス血清との反応も陰性であった。

ELISA 法による解離液中のサブクラス測定結果は、症例 1 は IgG₁, IgG₂, IgG₃ が、症例 3 では IgG₁, IgG₃ の検出が確認された。症例 2 は ELISA 法にても検出されなかった (表 4)。

2) IAT 陽性の血清:

IAT 陽性母体血中の対応抗体は、いずれも IgG 特異的クームス血清と反応した。IgG サブクラス特異的クームス血清を用いた解析結果も表 4 に示した。

症例 1 の抗 B, 抗 A 抗体はともに IgG₁, IgG₂, IgG₃ で、抗 A 抗体の方が強い凝集反応を呈した。なかでも IgG₂ がもっとも強く反応した。患児血中抗体も同様の傾向が認められた。患児の IgG 抗 B 抗体価は 1:8 であった。症例 2 における抗 Le^a 抗体の IgG サブクラスは IgG₂ の方がやや優位な傾向にあった。

母児ともに IAT 陽性の症例 3 では IgG₁ と IgG₃ の抗 C 抗体が IgG₂ よりも優位な傾向を呈した。症例 4 では、3 種類の抗赤血球抗体はいずれも IgG 性で、抗 E が IgG₂ を含む 3 種のサブクラスからなり、抗 c と抗 Jr^a 抗体は IgG₁ と IgG₃ のものが検出された (表 4)。

抗赤血球抗体産生性 B リンパ球

抗赤血球不規則抗体の産生をみた 4 症例のうち、B リンパ球と対応抗原陽性パネル赤血球との明瞭なロゼット形成を呈したのは HDN を惹起した 2 症例であった (表 4)。

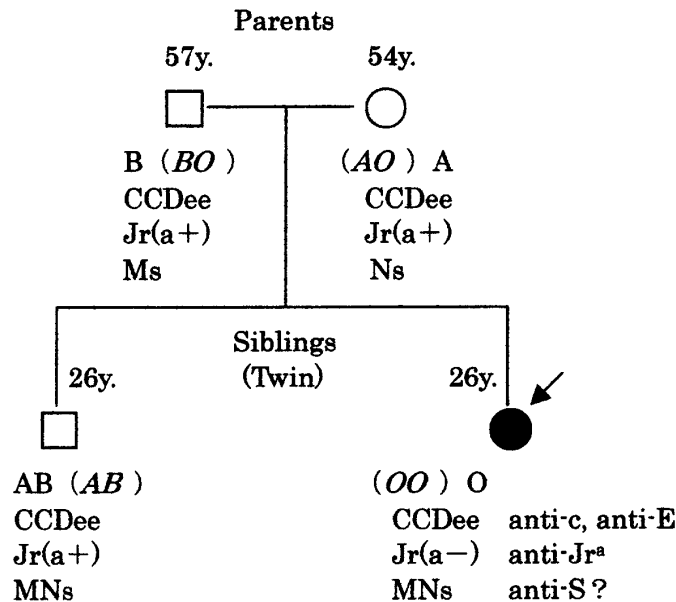


Figure 1. A pedigree study including the 4th case. She is a nulligravida who has received alloblood transfusion at the time of an ureteral operation. The transfused blood groups were O, ccDEE, Jr(a+).

Jr(a-) 症例の家系調査と供血者血液型調査

高頻度抗原のひとつである Jr^a 抗原を欠く症例 4 について、両親と双子の兄を含む 4 人の主な血液型の調査結果を図 1 に示した。ABO が一致する者や Jr(a-) 型は同一家族内に存在しなかった。3 年前の被輸血血液製剤に関する遡及的調査から、供血者の血液型は O, ccDEE, Jr(a+) であった。

考 察

本研究の端緒は、本学学生の中に日本人の代表的高頻度抗原である Fy^a, Di^b, Jr^a などの血液型抗原を欠き、“まれ血”として登録しておくことが望ましい者が複数在籍し、Jr^a 抗原を欠く未妊・未産の女子は 3 年前の一回の輸血を背景として臨床的に重要な同種免疫抗体を、しかも複数産生している現実を目の当たりにしたことにある。一方、過去に産科、小児科における HDN などの診断、治療、予防に際して臨床検査医学専攻の立場から関与し、数症例の貴重な血液試料を凍結保存する機会に恵まれた。

溶血性副作用や HDN などのいわゆる“同種免疫病”は、母児間であれ個体間であれ、血液型不適合輸血を背景とするが、免疫原として成立するか否かの抗原側の要因は受血者がその血液型抗原を欠くものであること、その抗原性の強弱と抗原量(輸血の量)の多寡にある。免疫応答を起こすか否かの受血者側の要因は、免疫系の発達段階と抗原受容の時期、免疫応答能力の有無と高低が重要である。

HDN の発症機序として広く知られていることは、① 児の血液型抗原を母体が欠くこと(血液型不適合妊娠)、② 児の赤血球が母体に輸血されること(transplacental hemorrhage, 以下、TPH と略す)、③ その血液型抗原に対して母体が抗体を産生すること(同種免疫の成立)、④ その抗体が胎盤通過性を有するもの(IgG クラス)で、胎児に移行すること、⑤ 移行した抗体が胎児赤血球と結合して胎児・新生児の赤血球寿命の短縮と溶血をもたらすこと、である⁵⁾。② については、正常な妊娠や分娩のみならず、流産、帝王切開や①に

対応する血液型抗原を同種間輸血されると成立する可能性があることは重要である。溶血は胎児・新生児の貧血と出生後の新生児の重症黄疸をもたらす。HDN の診断基準は RhD を主体とする Rh 血液型不適合によるものについてはすでに確立している⁵⁾。⑦ 母児間に Rh 不適合(D のみならず E, c, C など)が存在すること、⑧ 児に貧血の所見があり、高ビリルビン(indirect bilirubin)血症、DAT 陽性であること、⑨ 母体血中に対応する抗 Rh 抗体が同定されること、によりなされている。ABO 血液型不適合による HDN の診断基準は未確立ながら、⑩ 早発黄疸を伴う高ビリルビン(indirect bilirubin)血症、⑪ 母児間に ABO 不適合の組み合わせがあり、⑫ 母体血中の IgG クラス抗体価が 512 倍以上と高値であることで、確定のためには更に、⑬ 児赤血球からの抗体解離試験陽性、⑭ ABO 同型赤血球を用いておこなう新生児血清の IAT が陽性、⑮ 児血清の A または B 赤血球の対応抗体価が 8 倍以上、などの検査所見が加味されて診断されることが多い⁶⁾。

HDN に関する上記の診断基準、発症機序に照らし合わせると、B 型不適合妊娠の症例 1 では⑫を除いて各診断基準に合致する。⑫については母親の抗 A 抗体価が 1,280 倍と高値であるものの、対応抗体である抗 B 抗体価は 320 倍と診断基準をやや下回っている(表 3)。新生児血中には IAT 陽性で抗体価 80 倍の抗 B 抗体のみならず、同じ IgG クラスからなる抗 A 抗体が同定された(表 4)。母のこの高力価な抗 A 抗体の産生と児血中での存在は、知能障害を有する第二子が A 型不適合による HDN でビリルビン脳症に至った疑いがもたれており、そうした血液型不適合妊娠歴を反映したものと考えられる(表 1)。ABO 不適合同種血輸血においても、抗 A 抗体によるものの方が抗 B 抗体によるものよりも溶血性副作用が強いことは周知のことである。第一子の血液型が不明ながら、患児の血中抗 B 抗体価が診断基準⑫を満たさなかったことから A 型である可能性が示唆される。第三子である患児と同一の B 型であれば、母体はブースターによるより高力価な抗 B 抗体の産生があってしかるべきである。

Rh 不適合妊娠と比較すると、ABO 不適合妊娠は HDN 発症機序の ②, ③ を満たすか否か不明であることが多い。抗 A, 抗 B 抗体は生まれながらにして正常同種抗体として規則的に血中に保持される抗体であり、その産生機序の詳細は未だ不明である。大半は IgM クラスからなるが、時には輸血歴、妊娠歴のない場合でも IgG クラスの抗 A, 抗 B 抗体を所有する者が存在する。そのために、③ の同種免疫の成立が ② の胎盤を経由する母児間輸血または同種間輸血によると断定できないことが多い。本症例も母体血中の抗体が IgM 抗体を検出しやすい食塩液法にて 160 倍の抗体価を呈し、対応抗体である抗 B 抗体は DTT 還元処理後の食塩液法で陰性化してもアルブミン・クームス法にて 320 倍の IgG 抗体が確認されている (表 3)。ABO 不適合性 HDN では DAT が陰性か微弱陽性に止まるものが多いために、Rh 不適合性 HDN 診断基準 ① の DAT 陽性であることを診断基準の一つとしないが⁶⁾、本例は 3+ 陽性と極めて強い凝集反応がみられている (表 2)。本症例にみられるように、④ の抗体が IgG クラスであることを証明する IAT や抗体解離試験が仮に陽性であったとしても ② ③ の決めてとはならず、このことが診断基準未確立の背景の一つになっている⁶⁾。

過去の RhD 不適合分娩を背景として、第二子の妊娠 13 週に不適合妊娠関連の検査受診を申し出て、IAT 陽性から IgG クラスの抗 Le^a 抗体が同定された症例 2 では、診断基準の ⑦ が RhD 不適合、① は軽度の高ビリルビン血症、DAT 疑陽性ながら ② の対応抗 RhD 抗体は同定されず、抗 Le^a 抗体が IAT で同定されている。しかし、新生児赤血球からの解離液には抗 Le^a, 抗 RhD などの不規則抗体が同定されなかった。Lewis 関連の不規則抗体は輸血関連検査時に検出されるものの中で最も多く、特に抗 Le^a 抗体は不規則抗体所有妊婦においても同様である⁷⁾。一般に、新生児の Le^a, Le^b 両抗原は未発達である、抗原が体液中に含まれるために抗体は中和されるなどの理由から、Lewis 式血液型不適合による HDN は起こらないとされている。しかし、抗 Le^a 抗体、抗 Le^b 抗

体によるマイルドな HDN 発症の報告もあるので⁸⁾⁹⁾、Le^c, Le^x など何らかの Le 関連抗原による感作を含めてさらに検討を加える必要がある。

RhC 不適合の症例 3 では、診断基準 ⑦ については C と e の不適合が、① 高ビリルビン血症、② についても不適合抗原に対応する抗 RhC 抗体が同定されていることから診断は容易である。しかし、臨床サイドは輸血歴を把握しながら夫婦間に ABO 不適合の組み合わせがあるものの RhD の不適合はないことから、妊娠中の IAT の検査をオーダーしていなかった。このようなケースではルチンの IAT が O 型血球を用いて行われるために、不規則抗体のうちの IgG 抗 A, 抗 B 抗体の検出が不可能でありやむを得ない面もある。しかし、輸血歴を考慮して ABO, RhD 以外の血液型に起因する不規則抗体検出を意図して IAT をオーダーすべきである。臍帯血の採取もなされなかったが、児の黄疸の異常からオーダーされた児の末梢血 DAT 検査時に、検査サイドの判断で実施された IAT も陽性であるとの結果報告を受けて、母親の IAT とそれに引き続き不規則抗体の同定検査依頼がなされた。こうした症例において検査サイドは D のみならず全 Rh 因子を独自の判断で検索する。そのことが生後 14 日目に実施されることになった患児への適合血輸血製剤を血液センターへ発注するのを容易にしたと自負している (表 2)。

光線療法を施行したにも拘わらず貧血が亢進して輸血療法が施行された背景は、母親血中の抗 RhC 抗体がアルブミン・クームス法にて 2,560 倍以上の高値を呈したこと、新生児血中の抗体価は未定量ながら比較的長期間 IAT 陽性 (生後 14 日目)であったことから、高濃度の IgG 性抗 RhC 抗体が胎児に移行したことは想像に難くない。D 因子以外の Rh 不適合性 HDN の責任抗体は大半が抗 E, 抗 c または抗 Ec によるものが多く¹⁰⁾¹¹⁾、その多くは過去の輸血によって惹起された抗体によると考えられており¹²⁾、発症機序 ② の同種免疫の成立が TPH によるものでは D, E に比べて C の報告は極めて少ない。本例は、未妊・未産の時期に多量の同種血輸血歴があるので (表 1)、供血者

の血液型を含む遡及的調査を試みたがその詳細を把握できなかった。輸血は少量のTPHよりも強力な抗原刺激であり⁹⁾、本例も過去の血液型不適合同種血輸血により免疫感作が成立したものと思われる。初妊婦で輸血から妊娠までの約7年の期間を考慮すれば、TPHは抗原の再刺激に関わった可能性が考えられる。

輸血が、骨髄や幹細胞移植などと同様に、臓器移植の一種であるとの認識は輸血医学や同種免疫学を専攻する者の間で広く共有されている。個体間の同種血輸血による新たな血液型の発見、GVH病など同種免疫病の機序の解明にみられるように、輸血を含む移植は医療を通して唯一おこなわれるヒトの実験免疫学的側面を持つ。妊娠可能な若年女子への輸血に際して血液の適正な選択がいかに大切であるか、改めて注意を喚起したい。

HDNの重症度に関与する因子として、母体側の因子は産生抗体の胎盤通過時期、量とIgGサブクラスが、胎児側の因子は胎児の組織・分泌物など抗体の赤血球結合阻止物質の有無、赤血球における対応抗原の発達程度と単核食細胞系の能力があげられる。IgGサブクラスについては、IgG₄を除くサブクラスの関与を指摘する報告が多いが、IgG₁、IgG₃の関与を重視する¹³⁾ものとIgG₁、IgG₂を重視する¹⁴⁾ものなど、必ずしも見解が一致しているわけではない。Pollockら¹³⁾はRhD不適合性HDNにおいて、IgG₁とIgG₃からなる抗D抗体の方がIgG₁単独のものより重症であるとしている。RhC不適合の症例3はIgG₁とIgG₃タイプである。Kumpelら¹⁴⁾は高親和性のFcγIIAレセプターを発現させたマクロファージを用いて、溶血の有無をABOとRh不適合の実験系で比較した。IgG₂タイプの抗A抗体が溶血を起こすのに、IgG₂タイプの抗RhD抗体は溶血を起こさない。この結果からKumpelらは高親和性レセプターを発現する食細胞をもつABO不適合の新生児において、赤血球の破壊にこの機序が重要であるとしている¹⁴⁾。ABOとRhの関与サブクラスの差は糖鎖抗原とポリペプチド抗原に対する免疫応答の違いにある。ABO不適合の症例1はIgG₂が優位である傾向が窺える(表4)。

Elsonら¹⁵⁾はRhD不適合妊娠を経験した8名の母体とRhDで十分に免疫刺激した女性ボランティア5名について、B細胞の抗原受容体(B cell receptor, 以下BCRと略す)を介したRhD赤血球とB細胞の結合を示すロゼット形成試験をおこない、それぞれ2名と5名の陽性結果を得ている。後者については、投与後6日目に陽性細胞の出現をみて10日目にピークに至っている。今回の検討では、それぞれの血液型不適合輸血を受容した4例の女性のうち、児がHDNを発症した2例において、赤血球抗原に対応するそれぞれのBCRを発現したB細胞が末梢血に存在することが示された(表4)。

Jr^a抗原は1970年にStraupらによって白人から見いだされた後、1976年にKendallが抗Jr^a抗体の臨床的意義についてはじめて言及したことから注目された高頻度抗原タイプの血液型である¹⁶⁾。本邦においては、NakajimaとItoによって本抗体による新生児溶血性疾患の症例が報告されている¹⁷⁾。抗Jr^a抗体は輸血や妊娠によって産生され、Jr(a+)血の輸血では悪寒、輸血赤血球寿命の短縮などの副作用が起こる¹⁶⁾。不適合妊娠ではDAT陽性で^{17)~19)}、解離試験も陽性であるもの¹⁹⁾、光線療法施行に至ったもの¹⁷⁾¹⁸⁾、などがある。しかし、一般に抗Jr^a抗体によるHDNは比較的軽症なABO不適合性HDNと同様と理解されている。

日本人のRhD陰性の頻度は0.5%であるが、Jr(a-)の頻度は約0.1%と推定される²⁰⁾ので、RhD陰性の1/5程度と考えられる。稀な血液型とは、一般に非常に頻度の低い血液型で輸血の際に適合血の得にくい血液型を総称している。しかし、RhD陰性が“まれ血”の対象となっていないのは少ないなりに登録者が十分確保されているからである。ちなみに全国のJr(a-)登録者(平成9年度末現在)は総計930名、症例4と同じO型・RhDのJr(a-)は287名である²¹⁾。

本邦におけるHDNの原因としてはABO不適合によるものが65%と最も高頻度で、全出生の約2%(1人/3,000出生)に認められる。ついでRh不適合によるものが約25%、その他の血液型不適

合によるものが10%である。近年、不規則抗体スクリーニングの導入とRhD免疫グロブリン投与の普及によって抗D抗体陽性の妊婦は激減した。RhD免疫グロブリン製剤投与による抗D抗体産生抑制のメカニズムを現代の免疫学学説²²⁾に基づいて推察すると、BCRを介する赤血球抗原の単独結合がB細胞の活性化シグナルとなるのに対して、胎児赤血球RhD抗原と投与された抗D抗体との免疫複合体がB細胞の高親和性FcγIIBレセプターとBCRを架橋するような形で両者に結合すると、B細胞の抑制性シグナルが作動することによると考えられる。

日本人の抗原出現頻度の特徴 (eeが49.8%, Eのホモとヘテロが50.7%)を背景として抗RhE不規則抗体が数多く検出されている輸血の現状に鑑みれば、今後、RhE不適合性HDNが相対的に高まると予想される。その抑制処置としてのRhE免疫グロブリン製剤は実在しない。

妊娠可能な子女には不必要な輸血を行わないことが大原則である。もしも輸血が必要な際には、本邦における前述の理由から、RhEを考慮することの必要性が指摘されて数十年が経過した。しかるに、症例4は抗Jr^aと臨床的により重要な抗RhEと抗RhC抗体を医原性に獲得している。いずれも胎盤通過性でポリペプチド抗原対応型とされるサブクラスIgG₁, IgG₃で、抗体価も高力価である。このように、血液型不適合の同種血輸血による免疫感作が成立してBCRも未だ陰性化していない。3年前のわずか1単位の輸血によってである。抗S抗体はしばしば重症で時には致死的である¹²⁾。

ま と め

妊娠前のRhC血液型不適合輸血を引き金とした母児間輸血による新生児溶血性疾患症例と、高頻度抗原のひとつである血液型Jr^aを欠いている未妊・未産の女性が同種血輸血によってJr^a抗体のみならず、今後の輸血と妊娠にとって臨床的に重要なRh関連のE抗体とc抗体を産生した症例などの遡及的調査結果を報告した。

輸血は臓器移植のひとつであり、医療を通して

唯一おこなわれるヒトの実験免疫学的側面を持つ。血液型不適合の同種血輸血は結果として患者本人への副作用にとどまらず、患者が若年女子の場合次の世代までもその影響を及ぼす。医療人はこのことに心したいものである。

謝 辞

稀な血液型の同定にご協力戴いた宮城県赤十字血液センターと福島県赤十字血液センター検査課の皆様へ深謝致します。

文 献

- 1) Meryman HT, Hornblower M: A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration, *Transfusion*, **12**, 145-156, 1972
- 2) Vengelen-Tyler V: Red cell typing methods, Technical Manual, 13th ed, American Association of Blood Banks, Bethesda, 1999, p 649-666
- 3) Vengelen Tyler V: Antibody detection, antibody identification and serologic compatibility testing, Technical Manual, 13th ed, American Association of Blood Banks, Bethesda, 1999, p 667-687
- 4) Vengelen-Tyler V: Investigation of positive direct antiglobulin test methods, Technical Manual, 13th ed, American Association of Blood Banks, Bethesda, 1999, p 689-703
- 5) Mollison PL, Engelfriet CP, Marcela Contreras: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed., Blackwell Science, Oxford, 1997, p 390-415
- 6) Mollison PL, Engelfriet CP, Marcela Contreras: Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th ed., Blackwell Science, Oxford, 1997, p 418-424
- 7) Daniels G: Human blood groups, 6th ed, Blackwell Science, Oxford, 1995, p 82-89
- 8) Carreras Vescio LA, Torres OW, Virgilio OS, Pizzolayo M: Mild hemolytic disease of the newborn due to anti-Le^a, *Vox Sang.*, **64**, 194-195, 1993
- 9) Bharucha ZS, Joshi SR, Bhatia HM: Hemolytic disease of the newborn due to anti-

- Le^b, *Vox Sang.*, **41**, 36-39, 1981
- 10) Kornstad L: New cases irregular blood group antibodies other than anti-D in pregnancy; frequency and clinical significance, *Acta Obstet. Gynec. Scand.*, **62**, 431-436, 1983
 - 11) Astrup J, Kornstad L: Presence of anti-c in the serum of 42 women giving birth to c positive babies; serological and clinical findings, *Acta Obstet. Gynec. Scand.*, **56**, 185, 1977
 - 12) Mollison PL, Engelfriet CP, Marcela Contreras: *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 10th ed., Blackwell Science, Oxford, 1997, p 415-417
 - 13) Pollock JM, Bowman JM: Anti-Rh(D) IgG subclasses and severity of Rh hemolytic disease of the newborn, *Vox Sang.*, **59**, 176-179, 1990
 - 14) Kumpel BM, van de Winkel JGJ, Westerdal NAC, Hadley G, Dugoujon JM, Blancher A: Antigen topography is critical for interaction of IgG2 anti-red cell antibodies with Fc γ receptors, *Brit. J Haemat.*, **94**, 175-183, 1996
 - 15) Elson CJ, Bradley J: Human peripheral blood leucocytes forming rosettes with rhesus (D) isoantigen, *Lancet*, **i**, 798, 1970
 - 16) Kendall AG: Clinical importance of the rare erythrocyte antibody anti-Jr^a, *Transfusion*, **16**, 646-647, 1976
 - 17) Nakajima H, Ito K: An example of anti-Jr^a causing haemolytic disease of the newborn and frequency of Jr^a antigen in the Japanese population, *Vox Sang.*, **35**, 265-267, 1978
 - 18) Orrick LR, Golde SH: Jr^a-mediated hemolytic disease of the newborn infant, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **137**, 135-136, 1980
 - 19) Toy P, Reid M, Lewis T, Ellisor S, Avoy DR: Does anti-Jr^a cause hemolytic disease of the newborn?, *Vox Sang.*, **41**, 40-44, 1981
 - 20) 大久保康人: 日本人のまれな血液型に関する研究, *関西医大誌*, **33**, 532-565, 1981
 - 21) 稀な血液型登録者—平成10年3月31日現在—: 大阪府赤十字血液センター稀な血液型調査研究班, 1999, p 66-84
 - 22) Ono M, Bolland S, Tempst P, Revetch JV: Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc γ RIIb, *Nature*, **383**, 236-266, 1996