한국인 헌혈자에서의 -D-/-D- 표현형 빈도

이미경^{1,*} · 정성이^{1,*} · 김진욱² · 김종필¹ · 김동현¹ · 박정란¹

대한적십자사 중앙혈액검사센터¹, 대한적십자사 혈액관리본부²

-D-/-D- Phenotype Frequency among Korean Donors

Mi Kyung Lee^{1,*}, Sung Yi Jung^{1,*}, Jin Uk Kim², Jong Phil Kim¹, Dong Hyun Kim¹, Jung Ran Park¹

Korean Red Cross Central Blood Laboratory Center¹, Seoul, Korean Red Cross Blood Services², Wonju, Korea

Background: To improve Rh-related antigen negative blood supply effectively, the Korean Red Cross (KRC) blood centers have performed Rh phenotype screening tests of C, c, E and e antigens for all donors since April, 2013. Especially for rare ‘-D-/-D-’ blood supply and donor recruitment, we have implemented Rh phenotype confirmation test for all C, c, E and e antigen negative donors. In this study, we report the test results of 7 donors with ‘-D-/-D-’ phenotype.

Methods: All three KRC Blood Laboratory Centers performed Rh phenotype screening tests using the automatic machine, PK7300 (Beckman Coulter, Japan), for all 876,920 donors from January 1, 2018 to April 30, 2018. We then performed the Rh phenotype confirmation test using the tube method manually, at room temperature, 37°C and antihuman globulin phase.

Results: Among 876,920 donors, 14 were Rh antigen C, c, E, e negative as results of Rh phenotype screening test. The results of Rh phenotype confirmation test of these 14 donors showed that 7 donors were Rh antigen C, c, E, e negative. The ratio of -D-/-D- phenotype for all donors was 0.000798%.

Conclusion: Our data suggests that -D-/-D- phenotype is one of the rare blood groups among Koreans. Although ‘-D-/-D-’ phenotype was confirmed by serologic tests, it is necessary to re-confirm it by molecular genetic techniques. (Korean J Blood Transfus 2018;29:182-187)

Key words: -D-/-D-, Rh phenotype, rare blood

서론

Rh 혈액형군은 사람 적혈구의 가장 복잡한 항원군으로서, D, C, c, E, e 항원을 포함하여 현재까

지 약 50여종의 항원과 변이형이 알려져 있다[1]. 이 중 가장 면역원성이 강하고 임상적으로 중요한 것은 D 항원으로 RhD 검사는 중요한 수혈전 검사의 필수항목이다. 그 외 항원은 환자가 감각

Received on July 11, 2018. Revised on July 27, 2018. Accepted on August 2, 2018

Correspondence to: Mi Kyung Lee

Korean Red Cross Central Blood Laboratory Center, 18 Gonghang-daero 69 gil, Gangseo-gu, Seoul 07559, Korea

Tel: 82-2-2657-0010, Fax: 82-2-2657-0005, E-mail: mkleee@redcross.or.kr, ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1441-3765>

*Mi Kyung Lee and Sung Yi Jung contributed equally as co-first authors.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright ©2018 The Korean Society of Blood Transfusion

되어 해당항원에 대한 항체(예, 항-E+c)가 발생할 경우 해당 항원이 없는 혈액을 선택하여 수혈해야한다. 그간 의료기관으로부터 대한적십자사 중앙혈액원에 의뢰된 특정항원음성혈액 요청건수를 살펴보면 약 46.6%가 Rh항원(C, c, E, e) 음성혈액 공급과 관련되어 있다[2]. Rh항원(C, c, E, e) 음성혈액의 원활한 공급을 위해 대한적십자사 혈액원에서는 모든 헌혈자에 대하여 2013년 4월부터 Rh 표현형 선별검사를 실시하였다(Table 1). 그런데, RhD 항원 이외의 Rh항원(C, c, E, e)이 모두 존재하지 않은 혈액형이 매우 드물지만 존재하는데, 이는 -D-/-D-형이다[3,4]. 이들 혈액형을 가진 환자는 D 항원이 존재하기 때문에 의료기관에서는 환자가 Rh항원(C, c, E, e)에 대한 항체가 발생하기 전까지는 일반 수혈전 검사에서는 검출할 수 없다. 이 혈액형이 임상적으로 중요한 이유는 해당 항체가 발생하면 동일한 -D-/-D-형만 수혈할 수 있고, 그 외 혈액은 수혈시 대부분 심각한 용혈이 발생하기 때문이다. 그래서, 일부 나라에서는 국가 사업으로 희귀혈액형등록사업을 실시하여 -D-/-D-형과 같이 희귀한 혈액형을 미리 검출하여 헌혈자를 확보하고 있다. 그러나 그간 국내 -D-/-D-형은 산발적인 증례 보고[5-7]만 존재하고, 전체 인구에서 그 빈도는 보고되지 않았다.

이에 본 연구에서는 Rh 표현형 선별검사결과

C, c, E, e 항원이 모두 음성인 헌혈자를 대상으로 Rh 표현형 확인검사를 수기법으로 실시하여 그 빈도를 구하여 국내 최초로 이를 보고하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

본 연구는 대한적십자사 혈액관리본부 생명윤리위원회의 승인을 받아 2018년 1월 1일부터 2018년 4월 30일까지 대한적십자사 중앙, 중부 및 남부혈액검사센터에서 검사한 모든 헌혈자를 대상으로 실시하였다. Rh 표현형 선별검사는 총 876,920명의 헌혈자를 대상으로 실시하였으며 이중 Rh 표현형 선별검사 결과 C(-), c(-), E(-), e(-)인 헌혈자에 대하여 Rh 표현형 확인검사를 실시하여 위음성 결과를 배제하였다.

2. 검사방법

Rh 표현형 선별검사는 자동화 마이크로플레이트 시스템인 PK7300 (Beckman Coulter, Shizuoka-ken, Japan)을 이용하였다. 검사시약은 Anti-C (DIAGAST, Avenue Eugene Anivee, France), Anti-c (DIAGAST), Anti-E (DIAGAST), Anti-e (DIAGAST)를 사용하였으며 적정 희석배수를 적용하였다.

Rh 표현형 확인검사는 Rh 표현형 선별검사에서 C(-), c(-), E(-), e(-)인 헌혈자에 대하여 Rh 표현형 선별검사시와 동일한 시약을 원액으로 사용하여 수기법인 tube법으로 실시하였다. 대조용 tube에 22% bovine albumin과 검체(2~5% 혈구부유액)를 각각 1 drop씩 넣고, 검사용 tube에는 각각 Rh 항원별 항혈청과 검체(2~5% 혈구부유액)를 각각 1 drop씩 넣었다. 혈청원심분리기를 사용하여 1,000 g에서 15초간 원심한 후 응집유무를

Table 1. History of Rh phenotype screening test in Korean Red Cross Blood Laboratory Centers

Test start date	Rh antigens
2013.04.19.	C, e
2014.06.17.	C, E, e
2015.08.03.	C, c, e
2016.06.07.	C, c, E, e

확인했다. 이 때 대조용 tube가 음성이고 검사용 tube에서 하나라도 1+이상 응집을 보이면 양성으로 판정하고 검사를 종료하였다. 모든 tube가 음성일 경우 tube내의 검체와 시약을 잘 혼합한 후 37°C 항온수조에서 30분간 항온하였으며, 원심한 후 응집 유무를 확인하였다. 0.9% saline으로 3회 세척한 후 대조용 및 검사용 tube에 항인글로불린 시약을 2 drop씩 넣고 잘 혼합하였다. 원심 후 응집 유무를 확인하였으며, 육안판정이 어려울 경우 현미경을 이용하였다. 검사결과 대조용과 검사용 tube가 모두 음성인 경우 IgG 감작적혈구를 1 drop씩 넣고 잘 혼합한 후 원심 후 응집 유무를 육안으로 확인하였다. 이 때 응집을 보이면 최종 음성으로 판정하고 검사를 종료하였으며, 응집이 없으면 재검사를 수행하였다(Table 2).

결 과

대한적십자사 혈액검사센터에서는 헌혈자 876,920명을 대상으로 Rh 표현형 선별검사를 실시하였으며 그 결과 14명이 C(-), c(-), E(-), e(-)였다(Table 3). 이 14명에 대하여 Rh 표현형 확인검사를 실시한 결과 CDe 가 5명, cDe 가 2명, C(-), c(-), E(-), e(-)인 -D-/-D- 표현형은 7명으로 확인되

어 그 빈도가 0.000798%임이 확인되었다(Table 4). 선별검사와 확인검사결과가 불일치했던 7명은 해당 항원이 확인검사 실온단계에서 2+이하로 약하게 발현하는 양상을 보였다.

고 찰

-D-/-D- 표현형은 *RHCE* 유전자의 결핍으로 인해 C, c, E, e 항원이 없이 D 항원만을 강하게 발

Table 3. Result of Rh phenotype screening test performed by PK7300

Rh phenotype	No. donors	%
CDe	364,759	41.6
CcDEe	330,807	37.7
cDE	78,701	9.0
CcDe	64,497	7.4
cDEe	29,392	3.4
CDEe	2,616	0.3
CcDE	640	0.07
cDe	1,751	0.2
CDE	44	0.005
-D-/-D-	14	0.0016
Rh(-)	3,631	0.4
Total donor no.	876,920	100

Table 2. Results of Rh phenotype confirmation test

Control tube result	Testing tube result			Results
	Room temperature phase	AHG phase	Coombs-control IgG phase	
-	-	-	-	Not determined*
-	-	-	+	Negative
-	-	±~4+	Not tested	Positive
-	±~4+	Not tested	Not tested	Positive
±~4+	±~4+	Not tested	Not tested	Not determined [†]

*retest; [†]perform direct antiglobulin test.

Abbreviation: AHG, antihuman globulin.

Table 4. Result of Rh phenotype confirmation test for 14 donors performed by standard tube tests

Rh phenotype	No. donors	% of total donors (876,920)
CDe	5	0.0006
cDe	2	0.0002
-D-/-D-	7	0.000798

현하는 것을 특징으로 하는 희귀한 혈액형이며 백인, 아시아인, 히스패닉, 아프리카 등 다양한 인종에서 보고되고 있다[3,4,8]. 그러나 국내에서는 1998년 이후 3건의 사례[5-7] 외에는 -D-/-D- 표현형 빈도에 대한 연구보고는 없었다. 국내 -D-/-D- 표현형 빈도에 대한 보고로서는 대한적십자사 혈액원의 헌혈자 총 876,920명을 대상으로 한 본 연구가 최초이며 4개월간의 비교적 짧은 연구기간이었음에도 불구하고 Okubo 등[9]이 일본 헌혈자 692,000명 중 7명의 -D-/-D- 표현형 발견 사례를 보고한 일본인 헌혈자에서의 -D-/-D- 표현형 빈도와 유사한 결과를 보여주었다.

자연성용혈성수혈반응을 초래하는 항체로 Rh 항체 및 Kidd, Duffy, Kell 항체 등이 알려져 있으며 이로 인해 수혈을 받은 환자가 사망에 이른 보고가 있었다. 그래서 만성적 수혈이 예상되는 환자에게 ABO, RhD 이외의 혈액형 항원 음성 혈액을 우선적으로 공급하는 방안이 고려되고 있다[10,11]. 특히 -D-/-D- 표현형을 가진 사람은 임신이나 수혈에 의해 감작될 경우, CcEe 항원복합체에 대하여 반응하는 항체인 항-Hro(Rh17)이 종종 형성되며, 산모의 혈청에 존재하는 항-Hro는 다양한 임상상의 신생아용혈성질환을 유발할 수 있다[12-14]. 이처럼 -D-/-D- 표현형을 가진 수혈자는 결핍된 유전자에 대한 면역항체가 생길 수 있기 때문에 -D-/-D- 표현형 혈액을 수혈 받아야 하므로 -D-/-D- 표현형을 가진 헌혈자 관리가 매우

중요하다. 우리나라에서 실제 -D-/-D- 표현형을 가진 환자에 대한 수혈 사례는 두 차례로서 2004년과 2017년에 지면을 통해 알려진 바 있는데 두 사례 모두 일본 적십자사에 보관된 냉동 적혈구를 공급받아 수혈한 사례로 우리나라에서도 희귀 혈액형 관리에 대한 필요성이 제기 된 바 있다[2]. 대한적십자사 혈액원에서는 현재 rare blood donor registry program을 통해 다양한 희귀혈액형 헌혈자를 확보하고자 노력하고 있으며[15] 본 연구결과가 도움이 되리라 생각한다. 본 연구는 혈청학적 검사법으로만 진행되어 적혈구에 적은 양의 항원만 발현하는 경우는 검출하기 어려운 한계를 가지고 있다[16].

Rh 항원의 경우 이미 그 다양성으로 인해 표현형(phenotype)과 유전자형(genotype)의 불일치에 대해서 국내외에서 많은 연구가 있어왔고[17-19] 특정항원음성혈액검사의 경우에도 최근 외국에서는 많은 수의 헌혈자를 대상으로 대량으로 검사할 수 있는 유전형검사시스템이 도입되고 있다[20,21]. 본 연구에서도 선별검사와 확인검사결과가 불일치했던 7명(CDe 5명, cDe 2명)은 해당 항원이 확인검사 실온단계에서 2+ 이하로 약하게 발현하는 양상을 보여 항원성이 약할 경우에는 선별검사에서 위음성의 가능성이 있음을 보여주었다.

따라서 국내 헌혈자에 있어서 -D-/-D- 표현형에 대한 보다 더 정확하고 유용한 정보와 통계를 얻기 위해서는 유전학적 검사를 포함한 추가연구가 필요하다고 생각한다.

요 약

배경: Rh 항원(C, c, E, e)음성혈액의 원활한 공급을 위해 대한적십자사 혈액원에서는 2013년 4월부터 모든 헌혈자에 대하여 Rh 표현형 선별검

사를 시행하여왔고 희귀혈액형(-D-/-D-) 공급 및 헌혈자 확보를 위해 2018년 1월 1일부터는 Rh 표현형 선별검사결과 C, c, E, e 항원이 모두 음성인 헌혈자를 대상으로 Rh 표현형 확인검사를 수기법으로 실시하고 있다. 본 연구에서는 Rh 표현형 확인검사 결과 -D-/-D- 표현형 7명이 발견되어 이를 보고하고자 한다.

방법: 2018년 1월 1일부터 4월 30일(헌혈일 기준)까지 대한적십자사 3개 혈액검사센터에서 검사한 모든 헌혈자 876,920명을 대상으로 자동화 장비 'PK7300'을 사용하여 Rh 표현형 선별검사를 시행하였고 선별검사결과 C(-), c(-), E(-), e(-)인 헌혈자를 대상으로 tube법을 이용하여 수기로 Rh 표현형 확인검사를 하였다.

결과: Rh 표현형 선별검사에서 876,920명 중 14명이 C(-), c(-), E(-), e(-)의 결과를 보였다. 이 14명에 대하여 Rh 표현형 확인검사를 실시한 결과 7명이 C(-), c(-), E(-), e(-)인 -D-/-D- 표현형으로 확인되었으며, 전체 헌혈자 대비 -D-/-D- 표현형의 비율은 0.000798%였다.

결론: -D-/-D- 표현형은 한국인의 매우 그 빈도가 낮은 희귀혈액형 중 하나임이 확인되었다. 비록 혈청학적 방법에 의해 -D-/-D- 표현형이 확인되었지만 향후 유전학적 검사를 추가로 실시하여 재확인이 필요할 것이다.

감사의 글

본 연구를 위해 많은 도움을 주신 조덕 교수님(성균관의대 삼성서울병원)께 감사의 뜻을 표합니다.

References

1. Fung MK, American Association of Blood Banks. Technical manual. 18th ed. Bethesda, Md: American Association of Blood Banks, 2014:317
2. Lee MK, Choi BC, Oh DJ, Jeong OJ, Kim MJ. A study to establish rare blood type donor registration system. Korean J Blood Transfus 2005;16:38-44
3. Daniels G. Human blood groups. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Science, 2002
4. Kemp TJ, Poulter M, Carritt B. A recombination hot spot in the Rh genes revealed by analysis of unrelated donors with the rare D--phenotype. Am J Hum Genet 1996;59:1066-73
5. Whang DH, Kim HC, Hur M, Choi JH, Park JS, Han KS. A successful delivery of a baby from a D--/D-- mother with strong anti- Hr0. Immunohematology 2000;16:112-4
6. Hwang JY, Suh IB, Shim JY, Cho JS, Lee DH. A case of fetal hydrops associated with maternal -D-/-D- phenotype. Korean J Obstet Gynecol 2006;49:1378-82
7. Um TH, Cho CR, Whang JH, Whang DH, Woon MS, Han KS. A case of D-/D-phenotype associated with moderate hemolytic disease of the newborn. Korean J Blood Transfus 2007;18:61-5
8. Westhoff CM, Vege S, Nickle P, Singh S, Hue-Roye K, Lomas-Francis C, et al. Nucleotide deletion in RHCE*cE (907delC) is responsible for a D--haplotype in Hispanics. Transfusion 2011;51:2142-7
9. Okubo Y. Pretransfusion testing with special reference to blood groups in Japanese. Tokyo: Ishiyaku Shuppan, 1991:40-1
10. Kim S, Hur M, Lee KM, Chun W. A case of delayed hemolytic transfusion reaction in a patient with anti-c, anti-E, and anti-Jk(b). Korean J Blood Transfus 2009;20:144-50
11. Kim KH, Kim BR, Choi JL, Woo KS, Kim JM,

- Ham JY. Difference of Rh phenotype between irregular antibody positive patients and RhD positive population in Korea. *Korean J Blood Transfus* 2014;25:60-8
12. Han KS, Park KU, Song EY. *Transfusion medicine*. 4th ed. Seoul: Korea Medical Book Publisher, 2014:212
13. Fung MK, American Association of Blood Banks. *Technical manual*. 18th ed. Bethesda, Md: American Association of Blood Banks, 2014:331
14. Salamat N, Bhatti FA, Hussain A, Ziaullah. Anti-Rh17 (anti-Hr0): a rare diagnostic and management problem. *J Pak Med Assoc* 2004;54:215-8
15. Lim AH, Kim TE, Park MH, Kim YB, Min HK. Study for the establishment of donor-based rare blood management system. *Korean J Blood Transfus* 2018;29(S):S142-3
16. Chang HE, Hwang SM, Hong YJ, Han M, Park JS, Park KU, et al. Genotyping for RhD and RhCEce antigens using free circulating nucleic acids in plasma and serum. *Korean J Blood Transfus* 2014;25:249-59
17. Tax MG, van der Schoot CE, van Doorn R, Douglas-Berger L, van Rhenen DJ, Maaskant-vanWijk PA. RHC and RHc genotyping in different ethnic groups. *Transfusion* 2002;42: 634-44
18. Yang HS, Lee MY, Park TS, Cho SY, Lee HJ, Lim G, et al. Primary anti-D alloimmunization induced by "Asian type" RHD (c.1227G>A) DEL red cell transfusion. *Ann Lab Med* 2015;35:554-6
19. Flegel WA, von Zabern I, Wagner FF. Six years' experience performing RHD genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion* 2009;49:465-71
20. Döschner A, Vogt C, Bittner R, Gerdes I, Petershofen EK, Wagner FF. RHCE alleles detected after weak and/or discrepant results in automated Rh blood grouping of blood donors in Northern Germany. *Transfusion* 2009;49:1803-11
21. Flegel WA, Gottschall JL, Denomme GA. Implementing mass-scale red cell genotyping at a blood center. *Transfusion* 2015;55:2610-5; quiz 2609